

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



TESIS DOCTORAL

**Efecto del péptido intestinal vasoactivo sobre los linfocitos Th17 y su relación
con otras subpoblaciones Th
implicación en enfermedades autoinmunes-inflamatorias**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Rebeca Gema Jimeno Lumeras

Directores

Yasmina Juarranz Moratilla
Javier Leceta Martínez

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid

**Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Biología Celular**



**Efecto del Péptido Intestinal Vasoactivo sobre los linfocitos Th17 y
su relación con otras subpoblaciones Th: implicación en
enfermedades autoinmunes/inflamatorias**

Rebeca Gema Jimeno Lumeras

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2014



Facultad de Biología
Dpto. Biología Celular (Morfología Microscópica)

C/ José Antonio Novais nº 2.
Ciudad Universitaria 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 49 81. Fax: 91 394 49 81

La Dra. **Yasmina Juarranz Moratilla** y el Dr. **Javier Leceta Martínez**, Profesores Titulares del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Dña Rebeca Gema Jimeno Lumeras, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado: "**Efecto del Péptido Intestinal Vasoactivo sobre los linfocitos Th17 y su relación con otras subpoblaciones Th: implicación en enfermedades autoinmunes/inflamatorias**", como Tesis Doctoral, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 11 de noviembre de 2014

VºBº DIRECTORES:

Fdo. Yasmina Juarranz Moratilla

Fdo. Javier Leceta Martínez

La interesada:

Fdo. Rebeca Gema Jimeno Lumeras



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al Fondo de
Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III
Proyecto PI12/00758 Ministerio de Sanidad
Proyecto PI080025 Ministerio de Ciencia e Innovación

A mis padres,
Vicente y Lourdes

Dice el refrán: “Es de bien nacido, ser agradecido”. Quizá por timidez nunca he expresado suficientemente mi gratitud, pero ahora ha llegado el momento de daros las GRACIAS. Espero poder reflejar aquí mi agradecimiento a todas las personas que habéis estado a mi lado en algún momento o durante todos estos años. No podría haber escrito esta Tesis sin vuestro esfuerzo, apoyo, comprensión y cariño.

Gracias a mi “**familia VIP**”, donde VIP no significa péptido intestinal vasoactivo, sino Very Important People. Porque habéis sido para mí, no importantes, sino cruciales a lo largo de todo este tiempo. Juntos hemos formado, más que un equipo, una familia, en la que yo he aportado poco pero he recibido mucho.

Gracias a la “**mamá**”, **Yasmina**. Tengo tantísimo que agradecerle que no sé por dónde empezar, ni tengo palabras para expresarlo. Gracias por ser para mí una madre, una maestra, una amiga, una compañera... Gracias por enseñarme todo lo que sabes, por la paciencia que has tenido conmigo, por confiar en mí, por tus abrazos y tus besos, por todo. Todas las páginas de esta Tesis llevan tu impronta, porque todo lo que sé, todo lo que hemos hecho ha sido gracias a ti. Eres el pilar en el que se sustenta este trabajo. Has sido para mí un ejemplo de persona buenísima, sencilla, trabajadora, entregada, capaz de hacer mil cosas a la vez... A la vez que un ejemplo excelente de maestra y científica. Hemos vivido muchísimos momentos juntas, en el laboratorio, pero también en la cafetería de Tere, las comidas del departamento... y ha sido un honor haberlos compartido contigo. Recuerdo con cariño muchos de ellos, en especial aquel día que hicimos nuestra propia comida de verano en Guzmán el Bueno. Guardo una imagen muy bonita de aquella comida. Por ese día y por todos, gracias Yasmi.

Gracias al “**papá**”, **Javier**. Gracias a ti entré a formar parte del equipo, asique tengo que agradecerle todo lo que he vivido a partir de ese día. Desde aquel momento te convertiste en mi maestro y compañero, y generosamente me enseñaste todo, con paciencia y cariño. También estas páginas se han podido escribir gracias a ti, a tu forma diferente de ver las cosas, a las preguntas que te planteas cuando te quedas pensativo y que nos hacen ponernos a pensar a los demás... Has sido para mí un ejemplo de persona buena y tranquila, que nunca se molesta por nada, paciente, trabajadora, que no se cansa de aprender y leer cosas nuevas... También has sido un verdadero ejemplo de científico y maestro. Contigo he compartido muchísimos momentos en el laboratorio, pero también en prácticas, exámenes en químicas, cafés, comidas del departamento... Recuerdo con cariño mis primeros días en el laboratorio, cuando aún era estudiante de colaboración, en los que a tu lado aprendí a cortar en el micrótopo, lo que me parecía realmente novedoso. Por aquellos primeros momentos y todos los que han venido después, gracias Javier.

Gracias a la “**mamá**” fundadora, **Rosa**. Gracias primeramente por acogerme en tu equipo. Gracias por hacer del equipo una familia, por priorizar siempre a la persona por encima de cualquier trabajo. Gracias por cuidar en todo momento de mí y estar siempre atenta a mis necesidades. Has sido para mí un ejemplo de persona cercana, buena, cariñosa... Eres también un modelo a imitar de científica, capaz de fundar tu propio grupo y dedicada toda tu vida a la ciencia, sin perder nunca de vista cuáles son las cosas prioritarias en la vida. Durante estos años, hemos vivido juntas muchos momentos, como los ratos juntas en la campana con las membranas cuando las chicas estaban de estancia, o las inmunes, que las aprendí gracias a ti. Pero también hemos compartido muchos momentos de ocio porque siempre propones planes cultural-gastronómicos, de esos de los que quedan recuerdos para siempre. Como mi primera comida con el grupo, en la que os di las gracias por acogerme y tú me dijiste que gracias a mí por elegiros. Después de todo este tiempo, me reitero expresando que la que debe estar agradecida soy yo.

Gracias también a “**mamá**” **Mari Carmen**. Gracias por todo lo que me has enseñado, por toda la ayuda que he recibido de ti durante estos años. Gracias por enseñarme con tanta paciencia y de forma tan dulce, haciendo que todo parezca sencillo. Gracias por ser una magnífica persona y una científica excelente y minuciosa. Gracias porque, aunque estás en medicina, siempre estás disponible para cualquier cosa. Hemos compartido juntas muchas vivencias durante estos años y me siento muy agradecida por ello. Recuerdo con afecto, mis primeros “**pinitos**” con la citometría en los ratones en los que a tu lado aprendí la técnica, sin saber entonces todo lo que vendría después...

Gracias a la “**hermana mayor**”, **Irene**. Gracias por toda la ayuda que me has brindado generosamente durante estos años, gracias por estar siempre disponible para resolver cualquier duda, cualquier problema informático, todo... porque siempre estás ahí para lo que se necesite. Gracias por compartir tus conocimientos, pero también tus anécdotas, tus tartas, tus refranes... Hemos vivido juntas muchas cosas todos estos años, como los buffys a medias de los que casi no quedaba nada, pero también muchos momentos especiales. Recuerdo nuestra primera noche juntas en el hotel de Luxemburgo en la que las confianzas nos tuvieron un buen rato entretenidas.

Gracias a mis “hermanas”, Mar, Selene e Iria, compañeras de viaje durante todo este tiempo. Gracias **Mar**, por ser para mí una hermana, una amiga, una compañera, una maestra... Gracias por todo tu cariño, por tu comprensión, por estar pendiente de mí, por tus consejos, por nuestras largas charlas, los sms... A lo largo de estos años hemos vivido juntas muchísimos momentos. Recuerdo nuestros ratos de confidencias en los viajes de vuelta a casa en la línea 6, en los que te bajabas una parada después para acompañarme más. Recuerdo cómo llorabas cuando nos despedimos antes de irte a Creta, bajé las escaleras del metro con un nudo en la garganta y aún hoy vuelve ese nudo al recordarlo. Por esos momentos, por todo, gracias Mar. Gracias **Selene**, por tu apoyo durante todos estos años. Gracias por el tiempo que hemos pasado juntas en el labo, como cuando me metía en la campana a ayudar con una membrana. Gracias por compartir conmigo no sólo ciencia, sino confidencias, buenos ratos, preparación de tortillas... Recuerdo las fiestas que organizamos en el Torreón de tu tío, en las que las tres éramos algo más que compañeras de laboratorio. Gracias a la “pequeña” de la casa, **Iria**. Gracias por compartir conmigo la carpeta de artritis, y el trabajo que eso conlleva. Gracias por toda tu ayuda, por estar pendiente de mí y sobre todo por tu buen humor. Llegaste a la familia unos años después, aun así nos ha dado tiempo a compartir muchos momentos. Recuerdo cuando te uniste al club de las tortillas, entre patata y patata estuviste muy pendiente de mí que acababa de reincorporarme de la baja. Gracias también a **Raúl**, que aunque ya no estás en el grupo, has formado parte de él. Te cruzaste en mi camino cuando estaba aprendiendo cómo hacer las inmunos. Viniste a que te enseñara y lo que hicimos fue aprender juntos. Gracias por el tiempo que compartimos y por seguir acordándonos de nosotras.

Gracias de nuevo a todo el grupo, siento haber convertido los agradecimientos en una carta de recuerdos, no he podido evitarlo. Son recuerdos que vivimos juntos y que nunca olvidaré, por todos ellos y por los que no están escritos, gracias.

Gracias a los **compañeros del departamento**. A nuestros vecinos, el grupo de “los chicos” con los que compartimos de todo, aparatos y material, pero también risas y comidas. A **David** y **Javi** por estar siempre dispuestos a ayudarme, especialmente por vuestra inestimable ayuda con el FCSExpress. Gracias también por todos los buenos momentos compartidos, por las clases de prácticas juntos, las comidas en Física, los cafés y las sobremesas. Gracias **Sarita**, por tu apoyo, pero sobre todo por ser mi fiel compañera de los solitarios agostos. Gracias al **Prof. Zapata**, por su compañía en la soledad de la biblioteca, por entretenernos al final de la comida, por compartir conmigo conocimientos y separatas. Gracias a **Sandra**, por tu apoyo y tus ánimos especialmente en esta etapa final, pero sobre todo por esa sonrisa que te caracteriza y da alegría en las tardes que se alargan. Gracias a **Laura** y **Alberto** por el tiempo que coincidimos juntos, por enseñarnos orgullosos vuestros bichos, por compartir con nosotros lo que necesitásemos, por guardarnos con paciencia el material autoclavado hasta que nos acordábamos de ir a buscarlo, pero sobre todo por vuestro apoyo y cariño. Gracias al **Prof. González**, por su apoyo logístico, por poner a nuestra disposición cualquier cosa que necesitásemos, el microscopio, el autoclave, etc. Gracias también por preocuparte de que no deje la biblioteca sola ningún día... Gracias al **Prof. Azcoitia**, por cedernos su incubador en momentos de vacas flacas y gracias también por las risas derivadas de las comidas del departamento. Gracias al **Prof. Fernández** por conseguir siempre sacarme una sonrisa, por visitarme todas las tardes durante estos años para darnos ánimos. Gracias también por estar disponible para ayudarme en lo profesional o en lo personal. Gracias a Teresa, por tu apoyo administrativo, pero sobre todo por estar siempre disponible y no dudar en atenderme aunque estés ocupada. Gracias a todos los miembros del departamento, porque hace muchos años que empezamos a vernos las caras por los pasillos y son muchos los momentos compartidos durante este tiempo. Gracias también al **Prof. Martínez Naves** y al **Prof. Gómez Del Moral**, que aunque sois de la Facultad de Medicina, fuisteis el punto de partida. Vosotros me disteis mi primera oportunidad como investigadora cuando tan sólo era una estudiante de cuarto de carrera. Siempre hay que recordar dónde uno ha empezado, por eso gracias por todo lo que me enseñasteis. Gracias también a **Bea**, por compartir conmigo lo que ibas aprendiendo. A tu lado hice mi primer Ficoll, en aquel momento no tenía ni idea de cuantos vendrían después...

Gracias a nuestros **colaboradores**, sin los cuales este trabajo no habría podido realizarse. Su esfuerzo ha hecho realidad los frutos de este trabajo. Gracias a **Rosa**, de la Unidad de Genómica de la facultad, por tu ayuda con las RT-PCR, por tus consejos y por introducirme en el mundo de la 384. Gracias a **Amalia**, del Centro de Apoyo a la Investigación de la universidad, por tu ayuda con la citometría a lo largo de estos años. Gracias a **Marina**, del CIEMAT por tu inestimable ayuda con la citometría, por tus múltiples consejos, y sobre todo por dedicarme tu tiempo y atención. Gracias a los médicos, al **Dr. Gonzalez-Álvaro**, al **Dr Pablos** y a la **Dra. Galindo** por compartir con nosotros las muestras de artritis. En especial al **Dr. Gonzalez-Álvaro**, por compartir, no sólo muestras, sino experiencia y conocimientos. Y gracias, sin duda, a los pacientes con AR, a los que literalmente os

hemos “sacado la sangre”. Con vuestra generosa donación ha sido posible realizar gran parte de este trabajo. Confío y espero que, más pronto que tarde, vuestro esfuerzo sea recompensado con el de todos los investigadores que se desviven por hallar solución para esta patología.

Gracias a mis amigos, que estáis a mi lado siempre, con los que tantos momentos buenos he disfrutado.

Gracias a mis amigos biólogos, Meri, Cris, Pedro, Manu y Bieito. También a Blanca, que aunque somos amigas desde mucho antes, ahora estás adoptada en el grupo de biólogos. Gracias por vuestra amistad incondicional, por aceptarme y quererme como soy, por compartir conmigo tantos momentos maravillosos desde que nos conocimos en la facul. A vuestro lado el frío de “la nevera” se convertía en calor, el calor de una amistad que continúa con el tiempo. Una amistad que me da alegría en los momentos buenos y apoyo en los malos. Gracias por todo chicos.

Gracias Ana, por tu gran amistad, a prueba de tiempo y distancia. Por tu apoyo, tus consejos, tu preocupación por mí en todo momento. Por todos los momentos compartidos en “tan sólo” los últimos 16 años.

Gracias a mis Chicas al poder!!! Laura y Patri, por estar siempre ahí. Gracias por preocuparos por mí, por vuestro apoyo. Pero sobre todo gracias por vuestra presencia en esas quedadas de chicas, en las que cambiamos el mundo y a los hombres en tan sólo una tarde.

Gracias Mari Carmen, por apoyarme siempre en todo. Por ser para mí una mami, una amiga, una hermana. Por estar siempre disponible y ser un apoyo incondicional. Y, sobre todo, por acordarte de mí todas las noches...

Gracias finalmente, pero en primer lugar, a mi familia, mi pilar en esta vida, en el que todo se sustenta y sin el cual no podría vivir.

Gracias a mis padres, Vicente y Lourdes, a quienes os debo todo. Gracias por hacerme ser como soy, por enseñarme los valores para ser una buena persona, por todo lo que os habéis esforzado por mí. Gracias Papá, por ser un ejemplo para mí. Por enseñarme el valor del esfuerzo y el trabajo. Por demostrarme que lo que uno quiere lo puede lograr con voluntad y tesón. Por dárme todo sin merecerme nada, gracias papi. Gracias Mamá, por ser también para mí un ejemplo de vida. Por enseñarme todo y de todo. Pero sin duda, gracias por enseñarme lo que significa amar incondicionalmente. Por dar tu vida por mí, gracias mami.

Gracias Sandra, por compartir tu vida entera conmigo desde que éramos tan sólo una célula. Por ser mi alma gemela, mi compañera de juegos, de alegrías, de tristezas, de miedos, de trabajos, de todo. Gracias por estar siempre a mi lado, por todo tu apoyo, por todo, porque es imposible resumir aquí todo lo que te debo. Gracias por ser parte de mí misma. Porque soy incapaz de imaginar la vida sin ti, gracias tola.

Gracias Víctor, por todo lo que hemos vivido juntos. Por ser un hermano maravilloso, por defender a tus hermanas pequeñas “por encima de todo”. Porque, aunque te cueste manifestarlo, adoras a tus chatis. Por compartir conmigo juegos y risas, pero también penas. Porque sé que si te necesito estarás ahí. Por ser bueno, por ser como eres, gracias victolo.

Gracias Ángel, por tu apoyo y tu interés en todas mis cosas. Por todos los buenos ratos que hemos vivido juntos desde que te convertiste en el sexto de la familia. Por tu buen humor, por tu cariño, pero sobre todo por regalarme otro hermano, gracias.

Gracias tía, por ser mi tía y mi mami. Por cuidar de mí como una hija y darme siempre tu cariño. Por estar tan pendiente de mí, por apoyarme en mis metas, por todos tus consejos. Por preguntar siempre ¿cómo va la tesis?, para acto seguido darme nuevos ánimos.

Gracias Abuela, porque sé que desde donde estás puedes ver que, después de todo, tu nieta ha terminado la tesis. Por todo lo que hiciste por mí, por todo el tiempo compartido contigo y el Abuelo, por las infinitas cosas que aprendí de ti, gracias abu.

Gracias Jay, por quererme tanto. Gracias por ser como eres, por comprenderme tan bien, por tener tanta paciencia conmigo, por apoyarme y sostenerme en los momentos malos, por hacerme reír tanto. Gracias por estar siempre conmigo, por haber sobrevivido a mi lado la distancia y las dificultades. Gracias por dejar absolutamente todo por mí. Por haberme cambiado la vida y hacerme tan feliz cada día, gracias Jay. .

Gracias a Tí, sin Quien nada soy. Gracias por la maravillosa vida que me has regalado. Todo te lo debo a Tí y todo lo espero en Tí.

Índice

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	
.....1 INTRODUCCIÓN	
BLOQUE I: RESPUESTA INMUNE	9
.....7	
1. INMUNIDAD INNATA.....	9
2. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	11
3. COMUNICACIÓN CELULAR EN EL SISTEMA INMUNE.....	13
3.1. CITOCINAS.....	13
3.1.1. Clasificación de citocinas.....	14
3.1.2. Receptores y mecanismos de transducción de señales de citocinas.....	15
3.1.3. Mecanismos reguladores de citocinas.....	18
3.2. QUIMIOCINAS.....	19
3.2.1. Clasificación de quimiocinas.....	19
3.2.2. Receptores y mecanismos de transducción de señales de quimiocinas.....	20
3.2.3. Mecanismos reguladores de quimiocinas.....	21
BLOQUE II: LINFOCITOS T COLABORADORES	22
1. CLASIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T COLABORADORES.....	23
1.1. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LINFOCITOS Th1.....	25
1.2. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LINFOCITOS Th2.....	27
1.3. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES.....	28
1.4. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE LINFOCITOS Th17.....	30
1.5. CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN DE OTROS LINFOCITOS Th.....	31
1.6. MODIFICACIONES DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th.....	33
1.7. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th.....	34
1.7.1. Mecanismos de amplificación de la diferenciación de linfocitos Th.....	35
1.7.2. Regulación cruzada entre subpoblaciones de linfocitos Th.....	36
1.7.3. Mecanismos de finalización.....	37
2. PLASTICIDAD LINFOIDE.....	37
2.1. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LA PLASTICIDAD LINFOIDE.....	38
2.2. MECANISMOS INDUCTORES DE PLASTICIDAD LINFOIDE.....	39
BLOQUE III: LINFOCITOS Th17	43
1. FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS Th17.....	43
1.1. CITOCINA IL-17.....	45
1.2. CITOCINA IL-21.....	51
1.3. CITOCINA IL-22.....	54
1.4. OTRAS CITOCINAS SECRETADAS POR LAS CÉLULAS Th17.....	57
2. DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS Th17.....	58
2.1. CITOCINAS NECESARIAS PARA LA DIFERENCIACIÓN Th17.....	59
2.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NECESARIOS PARA LA DIFERENCIACIÓN Th17.....	61
2.3. RELACIONES RECÍPROCAS EN LA DIFERENCIACIÓN Th17 Y Treg.....	62
2.4. FASES DE LA DIFERENCIACIÓN Th17.....	64

2.5. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN Th17.....	66
3. HETEROGENEIDAD Y PLASTICIDAD DE LOS LINFOCITOS Th17.....	71
3.1. HETEROGENEIDAD DE LOS LINFOCITOS Th17.....	72
3.2. PLASTICIDAD DE LOS LINFOCITOS Th17.....	74
BLOQUE IV: PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.....	78
1. NEUROINMUNOMODULACIÓN.....	78
2. PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.....	80
2.1. DESCUBRIMIENTO Y ORIGEN EVOLUTIVO DE VIP.....	81
2.2. GEN <i>VIP</i>	82
2.3. PÉPTIDO VIP.....	85
3. DISTRIBUCIÓN DE VIP.....	86
3.1. DISTRIBUCIÓN GENERAL DE VIP.....	86
3.2. DISTRIBUCIÓN DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE.....	87
4. ACCIONES BIOLÓGICAS DE VIP.....	89
4.1. ACCIONES BIOLÓGICAS GENERALES DE VIP.....	89
4.2. ACCIONES BIOLÓGICAS DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE.....	92
4.2.1. Efectos de VIP sobre la producción de factores solubles.....	93
4.2.2. Efectos de VIP sobre la inmunidad innata.....	95
4.2.3. Efectos de VIP sobre la inmunidad adaptativa.....	96
4.2.4. Efectos biológicos de VIP sobre los linfocitos T colaboradores.....	98
5. RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE VIP.....	100
5.1. VPAC ₁	101
5.2. VPAC ₂	102
5.3. PAC ₁	103
5.4. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE VIP.....	104
5.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE VIP.....	105
5.6. RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE.....	108
BLOQUE V: INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD.....	111
1. ARTRITIS REUMATOIDE.....	111
1.1. MANIFESTACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	114
1.1.1. Desarrollo de la respuesta inflamatoria en la artritis reumatoide.....	114
1.1.2. Mediadores solubles en la artritis reumatoide.....	117
1.2. ARTRITIS REUMATOIDE Y LINFOCITOS T COLABORADORES.....	120
1.3. TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	123
2. DIABETES AUTOINMUNE.....	124
2.1. MANIFESTACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA DIABETES AUTOINMUNE.....	126
2.1.1. Desarrollo de la respuesta inflamatoria en la diabetes autoinmune.....	127
2.1.2. Mediadores solubles en la diabetes autoinmune.....	131
2.2. MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL NOD.....	132
2.2.1. Etiología de la diabetes autoinmune en los ratones NOD.....	133
2.2.2. Desarrollo de la diabetes autoinmune en los ratones NOD.....	134
2.3. DIABETES AUTOINMUNE Y LINFOCITOS T COLABORADORES.....	136

2.4. TRATAMIENTO DE LA DIABETES AUTOINMUNE.....	139
3. LINFOCITOS Th17, INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD.....	140
3.1. LINFOCITOS Th17 Y ARTRITIS REUMATOIDE.....	140
3.1.1. Generación y/o activación de los linfocitos Th17 en la artritis reumatoide.....	142
3.1.2. Función de los linfocitos Th17 en la artritis reumatoide.....	142
3.1.3. Linfocitos Th17 y tratamiento de la artritis reumatoide.....	148
3.2. LINFOCITOS Th17 Y DIABETES AUTOINMUNE.....	151
3.2.1. Generación y/o activación de los linfocitos Th17 en la diabetes autoinmune.....	152
3.2.2. Función de los linfocitos Th17 en la diabetes autoinmune.....	153
3.2.3. Linfocitos Th17 y tratamiento de la diabetes autoinmune.....	156
4. VIP: AGENTE TERAPÉUTICO EN INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD.....	156
4.1. VIP COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	160
4.2. VIP COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN LA DIABETES AUTOINMUNE.....	163
OBJETIVOS.....	165
ARTÍCULOS.....	169
1. ARTÍCULO 1.....	171
2. ARTÍCULO 2.....	183
3. ARTÍCULO 3	197
4. ARTÍCULO 4	213
5. ARTÍCULO 5	225
DISCUSIÓN.....	239
CONCLUSIONES.....	281
BIBLIOGRAFÍA.....	285
RESUMEN INGLÉS (ABSTRACT).....	327
OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	335

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Familia de citocinas y receptores de la IL-17.....	46
Tabla 2. Citocinas involucradas en la diferenciación de las células Th17.....	59
Tabla 3. Citocinas involucradas en la plasticidad de las células Th17 hacia Th1.....	76
Tabla 4. Distribución general de VIP.....	87
Tabla 5. Acciones biológicas generales de VIP.....	90
Tabla 6. Acciones biológicas de VIP sobre la producción de inmunoglobulinas.....	94
Tabla 7. Agonistas y antagonistas de los receptores de VIP.....	105
Tabla 8. Vías de señalización no canónicas de los receptores VPAC ₁ y VPAC ₂	107
Tabla 9. Citocinas involucradas en el desarrollo de la artritis reumatoide.....	119
Tabla 10. Características de la diabetes autoinmune en humanos y en ratones NOD.....	133
Tabla 11. Funciones principales de IL-17A en artritis reumatoide.....	144
Tabla 12. Th17 y tratamiento de la AR: posibles estrategias terapéuticas.....	150
Tabla 13. Efectos terapéuticos de VIP en modelos experimentales de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes.....	158
Tabla 14. Principales estrategias terapéuticas para el tratamiento con VIP.....	159

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Respuesta inmune innata y adaptativa.....	10
Figura 2. Fases de la diferenciación de las células T colaboradoras.....	25
Figura 3. Características y diferenciación de las células Th1.....	26
Figura 4. Características y diferenciación de las células Th2.....	28
Figura 5. Características y diferenciación de las células Treg.....	29
Figura 6. Características y diferenciación de otros linfocitos Th.....	32
Figura 7. Plasticidad de las células T colaboradoras.....	38
Figura 8. Familia de citocinas y receptores IL-17.....	48
Figura 9. Vía de señalización IL-17/IL-17R.....	49
Figura 10. Función de la IL-17 en la defensa de las mucosas.....	50
Figura 11. Vía de señalización IL-21/IL-21R.....	53
Figura 12. Vía de señalización IL-22/IL-22R.....	56
Figura 13. Relaciones recíprocas y plásticas en la diferenciación de las células Th17 y Treg.....	64
Figura 14. Fases de la diferenciación de las células Th17.....	65
Figura 15. Regulación de la diferenciación de las células Th17.....	67
Figura 16. Heterogeneidad de las células Th17.....	73
Figura 17. Plasticidad de las células Th17 hacia el fenotipo Th1.....	77
Figura 18. Neuroinmunomodulación.....	79
Figura 19. Familia de péptidos Secretina/VIP.....	82
Figura 20. Región promotora del gen VIP.....	84
Figura 21. Procesamiento del péptido VIP.....	85
Figura 22. Efectos biológicos de VIP sobre el sistema inmune.....	92
Figura 23. Acciones biológicas de VIP sobre las células Th.....	99
Figura 24. Vías de señalización del péptido VIP.....	106
Figura 25. Factores genéticos y ambientales asociados a la artritis reumatoide.....	112
Figura 26. Manifestaciones inmunológicas en la artritis reumatoide.....	115
Figura 27. Factores genéticos y ambientales asociados a la diabetes autoinmune.....	125
Figura 28. Manifestaciones inmunológicas en la diabetes autoinmune.....	127
Figura 29. Principales hallazgos sobre la implicación de IL-17 en la AR.....	141
Figura 30. Función de las células Th17 en la artritis reumatoide.....	143
Figura 31. Principales hallazgos sobre la implicación de IL-17 en la diabetes autoinmune.....	152
Figura 32. Función de las células Th17 en la diabetes autoinmune.....	154
Figura 33. Acciones biológicas de VIP en la artritis reumatoide.....	160
Figura 34. Acciones biológicas de VIP en la diabetes autoinmune.....	164

Abreviaturas

-A-

AC: Adenilato Ciclasa

ACPA: Anticuerpo frente a proteínas citrulinadas (del inglés *Anti-Citrullinated Peptide Antibody*)

AhR: Receptor de aril hidrocarburos (del inglés *Aryl hydrocarbon Receptor*)

AP-1: Proteína activadora 1 (del inglés *Activator Protein-1*)

APC: Célula presentadora de antígeno (del inglés *Antigen Presenting Cell*)

AR: Artritis Reumatoide

ARF: Factor de ribosilación de ADP (del inglés *ADP-Ribosilation Factor*)

-B-

BAFF: Factor activador de células B (del inglés *B-cell Activating Factor*)

BB: Cepa de ratas diabéticas (del inglés *BioBreeding*)

Bcl-X: Proteína X del linfoma de células B (del inglés *B-cell lymphoma X*)

BCR: Receptor del linfocito B (del inglés *B Cell Receptor*)

-C-

CCL: Quimiocina tipo C-C (del inglés *chemokine C-C motif Ligand*)

CCR: Receptor de quimiocina tipo C-C (del inglés *C-C chemokine Receptor*)

CD: Grupo de diferenciación (del inglés *Cluster of Differentiation*)

CIA: Artritis inducida por colágeno (del inglés *Collagen Induced Arthritis*)

CLP: Ligadura y punción cecal (del inglés *Cecal Ligation and Puncture*)

CMC: Candidiasis Mucocutánea Crónica

ConA: Concanavalina A

COX-2: Ciclooxygenasa-2

CRE: Elemento de respuesta a AMPc (del inglés *cyclic AMP Response Element*)

CTL: Linfocito T citotóxico o citolítico (del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*)

CTLA: Antígeno asociado a linfocito citotóxico (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen*)

CX3CL1: Quimiocina tipo CX₃C (del inglés *chemokine C-X₃-C motif Ligand 1*)

CXCL: Quimiocina tipo C-X-C (del inglés *chemokine C-X-C motif Ligand*)

CXCR: Receptor de quimiocina tipo C-X-C (del inglés *C-X-C chemokine Receptor*)

CyRE: Elemento de respuesta a citocinas (del inglés *Cytokine-Responsive Element*)

-D-

DC: Células dendrítica (del inglés *Dendritic Cell*)

DMARD: Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (del inglés *Disease-Modifying AntiRheumatic Drugs*)

-E-

EAE: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

EAU: Uveoretinitis experimental autoinmune (del inglés *Experimental Autoimmune Uveoretinitis*)

Eomes: Eomesodermina

ets: Factor de transcripción de la familia E26 (del inglés *E-twenty-six*)

-F-

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés *Fibroblast Growth Factor*).

FLS: Sinoviocito de tipo fibroblástico (del inglés *Fibroblast-Like Synoviocyte*)

Foxp3: Factor de transcripción denominado *Forkhead box protein 3*

FR: Factor Reumatoide

-G-

GAD65: Enzima ácido glutámico descarboxilasa 65 (del inglés *Glutamic Acid Decarboxylase 65*)

GATA3: Proteína 3 de unión a GATA

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos (del inglés *Granulocyte Colony Stimulating Factor*)

Gfi-1: Factor de crecimiento independiente 1 (del inglés *Growth factor independent-1*)

GIP: Péptido inhibidor gástrico o péptido insulínico dependiente de glucosa (del inglés *Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*) o Proteína de interacción con GPCRs (del inglés *GPCR Interacting Protein*)

GITR: Receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (del inglés *Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein*)

GLP: Péptido similar a glucagón (del inglés *Glucagon Like Peptide*)

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (del inglés *G Protein-Coupled Receptors*)

GRF: Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (del inglés *Growth Hormone-Releasing Factor*)

GZMB: Granzima B

-H-

HB-EGF: Factor de crecimiento endotelial unido a heparina (del inglés *Heparin-Binding Endothelial Growth Factor*)

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos (del inglés *Hepatocyte Growth Factor*)

HHA: Eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal

HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés *Human Leukocyte Antigen*)

-I-

IA-2: Antígeno 2 asociado a insulinoma (del inglés *Islet Antigen-2*)

ICAM-1: Proteína de adhesión intracelular 1 (del inglés *Intracellular Adhesion Molecule-1*)

ICOS: Proteína inducible co-estimuladora de células T (del inglés *Inducible T cell COStimulator*)

Idd: Loci asociados a la susceptibilidad a padecer diabetes (del inglés *Isulin-Dependent Diabetes*)

IDO: Enzima Indolamino-2,3-Dioxigenasa

IFN γ : Interferón gamma

Ig: Inmunoglobulina

IL-X: Interleucina X

IL-22BP: Proteína de unión a IL-22 (del inglés *IL22 Binding Protein*)

IL-22RA2: Receptor de IL-22 alfa 2 (del inglés *IL22 Receptor Alpha 2*)

IL-TIF: Factor inducible derivado de células T relacionado con la IL10 (del inglés *IL-10-related T cell-derived Inducible Factor*)

IL-XR: Receptor de interleucina X (del inglés *Interleukin x Receptor*)

iNKT: Linfocito T citolítico natural invariante (del inglés *invariant Natural Killer T cell*)

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *inducible Nitric Oxide synthase*)

IRF: Factor regulador de interferón (del inglés *Interferon Regulatory Factor*)

iTreg: Linfocito T regulador inducido

-J-

Jak: Proteína Janus (del inglés *Janus kinase*)

-K-

KDa: Kilo Dalton

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos (del inglés *Keratinocyte Growth Factor*).

-L-

lcnRNA: ARN largo no codificante (del inglés *long non-coding RNA*)

Lfa: Linfotóxina alfa

LPS: Lipopolisacárido

Lti: Célula inductora de tejido linfóide (del inglés *Lymphoid Tissue inducer*)

-M-

MALT: Tejido linfóide asociado a mucosas (del inglés *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*)

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

M-CSF: Factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos (del inglés *Macrophage Colony Stimulating Factor*)

M-CSFR: Receptor del factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos (del inglés *Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor*)

MDA-5: Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5 (del inglés *Melanoma Differentiation Associated protein 5*)

MEF-2: Factor potenciador específico de miocito 2 (del inglés *Myocyte Enhancer Factor-2*)

miRNA: micro ARN (del inglés *micro RNA*)

MLS: Sinoviocito de tipo macrofágico (del inglés *Macrophage-Like Synoviocyte*)

MMP: Metaloproteína de matriz (del inglés *Matrix Metallo-Proteinases*)

-N-

ncAP-1: Proteína activadora no canónica 1 (del inglés *noncanonical Activator Protein-1*)

NF κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK: Linfocito citolítico natural (del inglés *Natural Killer*)

NKT: Linfocito T citolítico natural (del inglés *Natural Killer T cell*)

NLR: Receptor tipo NOD (del inglés *NOD-Like Receptor*)

NOD: Ratón diabético no obeso (del inglés *Non Obese Diabetic*)

NOS2A: Isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa 2 (del inglés *Nitric Oxide Synthase 2*)

nTreg: Linfocito T regulador natural

-O-

ON: Óxido Nítrico

OPG: Osteoprotegerina

-P-

PACAP: Péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (del inglés *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polipeptide*)

PAM: Monooxigenasa alfa-amidantes de peptidil-glicinas (del inglés *Peptidil-glycine alpha-Amidating Monooxygenase*)

PAMP: Patrón molecular asociado a microorganismos patógenos (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*).

pb: Pares de bases

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1 (del inglés *Programmed cell Death 1*)

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés *Platelet-Derived Growth Factor*)

PGE2: Prostaglandina E2

PHM: Péptido Histidina Metionina

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa (del inglés *Phosphoinositide 3 Kinase*)

PIAS: Proteínas inhibidoras de STAT activado (del inglés *Protein Inhibitors of Activated STAT*)

PKC: Proteína cinasa C (del inglés *Protein Kinase C*)

PLC: Fosfolipasa C (del inglés *Phospholipase C*)

PLD: Fosfolipasa D (del inglés *PhosphoLipase D*)

PMA: Acetato de forbol miristato (del inglés *Phorbol Myristate Acetate*)

PRR: Receptor de reconocimiento de patógenos (del inglés *Pattern Recognition Receptor*)

PTPN22: Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (del inglés *Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22*)

PU.1: Factor de transcripción también denominado Spi-1 (del inglés *SFFV proviral integration-1*)

-R-

RAMP: Proteína modificadora de la actividad del receptor (del inglés *Receptor Activity-Modifying Protein*)

RANK: Receptor activador de NFκB (del inglés *Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa*)

RANKL: Ligando de unión a RANK (del inglés *Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa Ligand*)

RE-1: Elemento restrictivo 1 (del inglés *Restrictive Element-1*)

RIG-1: Gen inducible por ácido retinoico 1 (del inglés *Retinoid acid Inducible Gene-1*)

ROR: Receptor huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico (del inglés *Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor*)

-S-

SI: Sistema Inmune

SIDA: Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

SOCS: Proteína supresora de las señales de las citocinas (del inglés *Suppressor Of Cytokine Signaling*)

SOD2: Enzima Superóxido Dismutasa 2

SP: Sustancia P

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*)

STZ: Estreptozotocina (del inglés *Streptozotocin*)

-T-

T1D: Diabetes tipo 1 o diabetes autoinmune (del inglés *Type 1 Diabetes*).

TAGAP: Proteína activadora de Rho GTPasa de activación de células T (del inglés *T-Cell Activation RhoGTPase Activating Protein*)

T-bet: Factor de transcripción también denominado factor de transcripción de unión a caja 21 o Tbx21 (del inglés *T-box transcription factor*)

TCR: Receptor del linfocito T (del inglés *T Cell Receptor*)

Tfh: Linfocito T colaborador folicular (del inglés *follicular helper T*)

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta (del inglés *Transforming Growth Factor beta*)

Th: Linfocito T colaborador (del inglés *T helper*)

TLR: Receptor tipo Toll (del inglés *Toll-Like Receptor*)

TNBS: Ácido TriNitroBencenoSulfónico

TNFAIP3: Proteína inducida por factor de necrosis tumoral alfa 3 (del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein-3*)

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TRAF: Factores asociados al receptor de TNF (del inglés *TNF Receptor Associated Factor*)

Treg: Linfocito T regulador

TSE: Elemento de expresión específica de tejido (del inglés *Tissue-Specifier Element*)

-U-

UCN: Urocortina

-V-

VCM-1: Proteína de adhesión a células vasculares 1 (del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VIP: Péptido intestinal vasoactivo (del inglés *Vasoactive Intestinal Peptide*)

-X-

XCL: Quimiocina tipo C (del inglés *chemokine C motif Ligand*)

-Z-

ZnT8: Transportador de zinc 8 (del inglés *Zinc Transporter 8*)

β: Cadena beta común

γ: Cadena gamma común

Introducción

BLOQUE I: RESPUESTA INMUNE

El término inmunidad hace referencia a la protección del organismo frente a agentes extraños. Las células y moléculas que están implicadas en la inmunidad constituyen el sistema inmune (SI) y la respuesta que desencadenan frente a la presencia de tales agentes se denomina **respuesta inmune**. Esta respuesta se subdivide a su vez en dos: una reacción temprana o **inmunidad innata** y una reacción tardía o **inmunidad adaptativa**. La suma de ambas de forma coordinada es lo que da lugar a una respuesta inmune completa y eficaz. Para ello, los dos tipos de respuestas forman un sistema integral en el que se establecen multitud de conexiones, siendo dependientes una de la otra. Por un lado, la respuesta inmune innata estimula la respuesta inmune adaptativa y modula su naturaleza. Por el otro, la respuesta inmune adaptativa potencia la respuesta inmune innata. Esta interrelación entre ambos tipos de respuesta se consigue mediante la comunicación, tanto de forma directa como indirecta, entre las células pertenecientes a la inmunidad innata y adaptativa. Fundamentalmente tiene lugar a través de las citocinas, las quimiocinas y los receptores de ambas. Resultado de esta comunicación, se produce la coordinación entre ambos sistemas que da lugar a la respuesta inmune eficaz, capaz de eliminar el agente causante del daño. (Peña, 2003; Male *et al.* 2007; Murphy *et al.* 2009; Abbas *et al.* 2012).

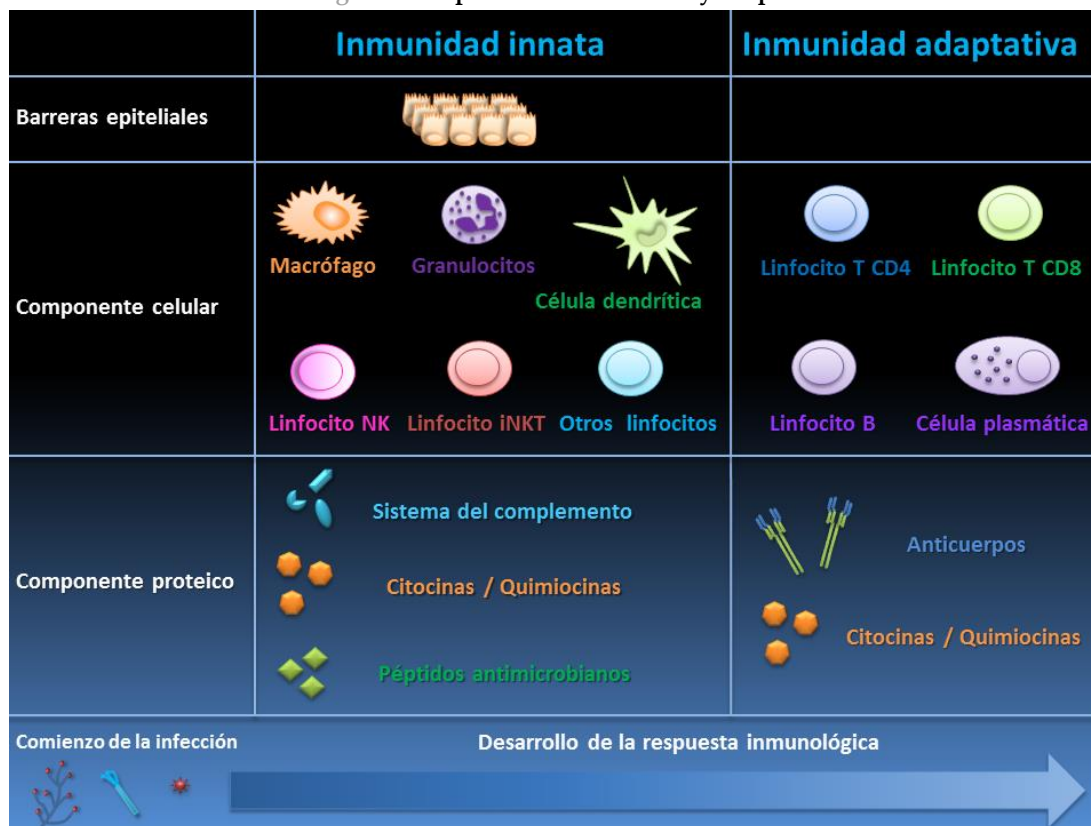
1. INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a la infección o el daño. Consta de mecanismos celulares y bioquímicos que tienen la capacidad de responder de forma inmediata frente a los agentes infecciosos o moléculas indicadoras de daño tisular. Esta respuesta se produce gracias al reconocimiento de estructuras compartidas por grupos de microorganismos relacionados o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), que tiene lugar a través de los receptores de reconocimiento de patógenos o de PAMPs (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*), como los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-Like Receptors*) (Janeway y Medzhitov, 2002; Kumar *et al.*, 2011). Esta respuesta inicial consigue impedir, controlar o eliminar la infección, así como eliminar las células dañadas e iniciar el proceso de reparación tisular. Los dos principales tipos de respuestas del SI innato son la inflamación y la defensa antivírica. La inflamación es un proceso consistente en el reclutamiento de leucocitos y proteínas plasmáticas desde la sangre hacia los tejidos en los que se localiza el foco de infección, donde tiene lugar su activación y la destrucción de los patógenos. Por su parte, la defensa antivírica consiste en la aparición de cambios celulares que impiden la replicación del virus y aumentan su sensibilidad a la acción de los linfocitos.

La inmunidad innata en su conjunto está formada por componentes de diversos tipos (véase *Figura 1*). Estos componentes son: **barreras físicas y químicas**, tales como los epitelios y las secreciones antimicrobianas que producen; **componentes celulares**, es decir células inmunes implicadas en los procesos de inmunidad innata; y **componentes proteicos**, que pueden ser citocinas, las cuales

desempeñan multitud de funciones desarrolladas por el componente celular, o proteínas sanguíneas, como las que forman parte del sistema del complemento.

Figura 1. Respuesta inmune innata y adaptativa.



Nota: Representación esquemática de los componentes que forman parte de las respuestas inmunes innata y adaptativa.

El componente celular de la inmunidad innata comprende diferentes tipos de células, tales como fagocitos, células dendríticas, algunos linfocitos y granulocitos. Los **fagocitos** son células del SI innato cuya función principal es identificar, fagocitar o ingerir, y destruir los microbios (Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012). Las células que forman parte de este grupo pueden ser neutrófilos o macrófagos. Los **neutrófilos** (fagocitos polimorfonucleares) son la población más abundante de leucocitos circulantes y se encargan de la destrucción de microorganismos patógenos (Dale *et al.*, 2008; Wilgus *et al.*, 2013). Por su parte, los **macrófagos** (fagocitos mononucleares) desempeñan importantes funciones tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, tales como ingerir y eliminar patógenos; participar en el proceso de “limpieza” tras una infección o un daño tisular ingiriendo células muertas del huésped; secretar citocinas; presentar antígenos a los linfocitos T; y promover la reparación tisular mediante angiogénesis y fibrosis (Wynn y Barron, 2010; Murray y Wynn, 2012; Wynn *et al.*, 2013). Por otro lado, las **células dendríticas** (DCs, del inglés *Dendritic Cells*) son células presentadoras de antígeno (APCs, del inglés *Antigen Presenting Cells*) cuya principal función es capturar antígenos microbianos y mostrárselos a los linfocitos T causando su activación, proliferación y diferenciación (Boltjes y van Wijk, 2014). Este tipo celular une la respuesta inmune innata con la adaptativa, por lo que puede ser considerado como un componente de ambos sistemas. Por su parte, los **linfocitos** son células características del SI adaptativo dada su capacidad de reacción frente a antígenos específicos. Sin embargo, algunos de sus miembros son propios del SI innato, ya

que poseen receptores invariables que no presentan especificidad. Los linfocitos implicados en la respuesta inmune innata son los **linfocitos citolíticos naturales** y los **linfocitos T y B con especificidad de antígeno limitada**. Los linfocitos citolíticos naturales (NK, del inglés *Natural Killer*) son un tipo de linfocitos que desempeñan importantes funciones en el SI innato, actuando frente a virus y bacterias intracelulares (Sun y Lanier, 2011; Vivier y Ugolini, 2011). Su nombre deriva de la capacidad de estas células para realizar su función citolítica sin diferenciación y expansión previa y su mecanismo de acción está basado en la liberación de gránulos citotóxicos hacia la célula diana (Sun y Lanier, 2011; Vivier *et al.*, 2011). Por otra parte, existen ciertos subgrupos de linfocitos T y B que presentan una diversidad de receptores de antígeno muy limitada relacionada con el reconocimiento de PAMPs (Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012). Los subgrupos de linfocitos T con especificidad limitada son: linfocitos T citolíticos naturales invariantes (iNKT, del inglés *invariant Natural Killer T cells*) y los linfocitos T con TCR (del inglés *T Cell Receptor*) de tipo $\gamma\delta$. Dentro del grupo de linfocitos B, los linfocitos con especificidad limitada son: linfocitos B-1 y linfocitos B de la zona marginal. Finalmente, los **mastocitos**, **basófilos** y **eosinófilos**, además de los neutrófilos, forman parte del grupo de células denominadas **granulocitos** o leucocitos polimorfonucleares. Estas células presentan numerosas funciones (Abraham y St. John, 2010; Min *et al.*, 2011; Jönson y Daëron, 2012; Kita, 2013). Su nombre se debe a las formas variables que puede presentar su núcleo y a que poseen un alto contenido en gránulos citoplasmáticos, los cuales contienen mediadores inflamatorios y antimicrobianos tales como citocinas e histamina, entre otros, que participan en la respuesta inmune innata (Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

2. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La inmunidad adaptativa consiste en una respuesta inmune que reconoce de forma específica el agente infeccioso. Se trata de una respuesta que es estimulada por la infección aumentando su magnitud con cada exposición sucesiva al mismo patógeno, por lo que también se le ha denominado inmunidad adquirida. Este tipo de inmunidad presenta dos características definitorias: la gran especificidad y la memoria o capacidad de “recordar” la respuesta frente a un antígeno determinado. La especificidad se basa en la existencia de un amplio repertorio de receptores presentes en los linfocitos capaces de reconocer regiones moleculares muy concretas. Tales receptores son el TCR presente en los linfocitos T y el BCR (del inglés *B Cell Receptor*) propio de los linfocitos B. Gracias a ellos, el SI adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar frente a un enorme número de patógenos y otras moléculas, por lo que también se le ha denominado inmunidad específica.

Los principales componentes que forman parte de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, entre los que se encuentran, además de las citocinas, los anticuerpos. En función de los componentes que participan en la respuesta frente a un patógeno, la respuesta inmune adaptativa puede ser de dos tipos: inmunidad humoral e inmunidad celular. Diferentes patógenos pueden desencadenar una u otra respuesta, lo que convierte al SI adaptativo un sistema altamente

especializado. (Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012). De forma resumida, las principales características de cada una de las respuestas son:

❖ Inmunidad humoral

La inmunidad humoral está basada en la acción de los anticuerpos. Se trata de moléculas presentes en el sistema sanguíneo y linfático y en las secreciones mucosas, que son producidas por los linfocitos B. Los anticuerpos reconocen las moléculas “extrañas” (**antígenos**) evitando así su potencial infeccioso y permitiendo su eliminación. Existen diferentes tipos de anticuerpos que pueden activar mecanismos efectores diversos lo que muestra que la respuesta humoral es una respuesta especializada. Este tipo de inmunidad constituye la principal defensa frente a los microorganismos extracelulares.

❖ Inmunidad celular

La inmunidad celular es llevada a cabo por medio de los linfocitos T. Este tipo de respuesta complementa la inmunidad humoral encargándose del aclaramiento de los patógenos intracelulares, que quedan fuera del alcance de ésta. Esta respuesta da lugar a la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos y otras células, así como a la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de la infección.

Tanto la respuesta humoral como la respuesta celular se caracterizan por una serie de propiedades que definen la respuesta inmune adaptativa. Estas características son: especificidad y diversidad, memoria inmunológica, expansión clonal y ausencia de reactividad frente a lo propio. La **especificidad** de la respuesta inmune adaptativa se debe a que se trata de una respuesta específica frente a un determinado antígeno. De hecho, la respuesta se produce frente a regiones concretas del antígeno que se denominan epítomos. La **diversidad** se consigue gracias a que existe un amplio repertorio de clones de linfocitos dotados de distintas especificidades. Por su parte, la **memoria inmunológica** se basa en el hecho de que la exposición a un antígeno favorece la capacidad del SI adaptativo para responder de nuevo frente a ese mismo antígeno. Esta cualidad se debe a que la exposición frente al antígeno genera células de memoria específicas que tienen una vida larga. Por otro lado, la **expansión clonal** se refiere a la proliferación de un grupo de linfocitos que pertenecen a un mismo clon y, por tanto, comparten receptores idénticos frente a un mismo antígeno. Por último, la **ausencia de reactividad frente a lo propio** tiene lugar ya que el SI presenta la capacidad de reconocer antígenos extraños sin activarse frente a antígenos propios del individuo. (Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

Los **linfocitos T** constan de varios subgrupos con características fenotípicas y funcionales diferentes. Existen dos grandes grupos de linfocitos T clasificados en función de la proteína de membrana que expresan. Los **linfocitos T colaboradores** o linfocitos T con grupo de diferenciación 4 (CD4, del inglés *Cluster of Differentiation 4*) o linfocitos T *helper* (Th, del inglés *T helper cell*), se caracterizan por la producción de citocinas en respuesta a un antígeno. Por otro lado, los **linfocitos T**

citotóxicos o citolíticos (CTL, del inglés *Cytotoxic T Lymphocyte*) o linfocitos T CD8, se encargan de la eliminación de las células portadoras de antígenos extraños en su superficie. Al igual que el resto de células sanguíneas, los linfocitos surgen a partir de precursores de médula ósea. Tras su generación, pasan por estadios de maduración complejos y secuenciales gracias a los cuales adquieren sus características fenotípicas y funcionales (Roth y DeFranco, 1995; Lai y Kondo, 2008). Después de su maduración en el timo (linfocitos T), los linfocitos se denominan linfocitos vírgenes o *naïve*. Estas células se caracterizan porque nunca se han expuesto al antígeno que reconocen y se encuentran en un estado de reposo. Una vez que se exponen al antígeno presentado por la APC, se produce la estimulación de los linfocitos *naïve*, lo que da lugar a la expansión clonal. Al activarse, los linfocitos aumentan su tamaño, pasando a denominarse linfoblastos, los cuales se diferencian dando lugar a linfocitos efectores o de memoria. Los linfocitos efectores son aquellos que tienen capacidad de respuesta frente al antígeno. Por su parte, los linfocitos de memoria son linfocitos que pueden sobrevivir en un estado inactivo durante meses o años tras el fin de la respuesta inmune y se encargan de la respuesta inmune desencadenada en sucesivas exposiciones frente a un mismo antígeno. (Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

3. COMUNICACIÓN CELULAR EN EL SISTEMA INMUNE

Como se menciona con anterioridad, el desarrollo de una respuesta inmune eficaz depende de la coordinación entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa, para lo cual es necesario que existan mecanismos de comunicación celular. Estos mecanismos permiten tanto la comunicación entre células del SI, como entre células del SI y células pertenecientes a otros sistemas. La comunicación puede ser directa, entre célula y célula, o puede estar mediada por moléculas solubles, las cuales permiten la comunicación entre células que no están en contacto directo. Este tipo de comunicación indirecta está ampliamente desarrollada en el SI y se lleva a cabo principalmente por dos tipos de moléculas, las citocinas y las quimiocinas.

3.1. CITOCINAS

Las citocinas son moléculas solubles no específicas de antígeno. Comprenden un amplio grupo de proteínas y glicoproteínas, que generalmente son de bajo peso molecular y están constituidas por un número de aminoácidos que varía desde 120 hasta 180. Principalmente las producen los linfocitos, aunque pueden ser secretadas por otros muchos tipos celulares. Por lo general se secretan de forma breve y limitada, pero su liberación es rápida y masiva, lo que provoca una respuesta muy eficaz. La comunicación intercelular que permiten las citocinas puede ser de diferentes tipos en función del alcance de su efecto. De este modo se distinguen la **comunicación autocrina**, que tiene lugar cuando la citocina actúa sobre la misma célula que la ha producido; la **comunicación paracrina**, que se produce cuando la citocina ejerce su acción sobre células cercanas; y la **comunicación endocrina**, que tiene lugar cuando la citocina actúa sobre células distantes tras su liberación al sistema sanguíneo o linfático. (Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

Las citocinas constituyen un grupo muy diverso de moléculas que presenta múltiples funciones tanto en el SI innato como adaptativo, mediando todos los aspectos de ambos sistemas. A pesar de la gran diversidad, existen dos características generales comunes a las diferentes citocinas: el **pleiotropismo** y la **redundancia**. El pleiotropismo tiene lugar ya que cada citocina es capaz de actuar sobre varios tipos celulares pertenecientes a diferentes tejidos, desempeñando diversas funciones. Por otra parte, las citocinas son redundantes puesto que diferentes citocinas pueden ejercer una misma función. Por tanto, los efectos biológicos causados por las citocinas pueden ser muy variados. Intervienen en distintos procesos celulares, tales como mitosis, diferenciación, migración, supervivencia y muerte celular. Además de su implicación en las respuestas inmunes, desempeñan importantes funciones en la embriogénesis y el desarrollo de órganos, así como en procesos neuroinmunes y neuroendocrinos. (Ozaki y Leonard, 2002; Borsih *et al.*, 2003; Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012)

3.1.1. Clasificación de citocinas

El conjunto de citocinas forma un grupo muy diverso que se agrupa en diferentes tipos en función de varios parámetros. De modo general, las citocinas pueden dividirse en dos grandes grupos en base a la respuesta inflamatoria que desencadenan: citocinas pro-inflamatorias y citocinas anti-inflamatorias o inmunosupresoras. Las **citocinas pro-inflamatorias** son aquellas que favorecen el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Pertenecen a este grupo, entre otras, la interleucina 1 (IL-1), la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*) y el interferón gamma (IFN γ). Por su parte, **las citocinas anti-inflamatorias** son aquellas que ejercen un efecto supresor de la respuesta inflamatoria, inhibiendo el crecimiento celular o suprimiendo la secreción de otras citocinas. Algunas citocinas pertenecientes a este grupo son la IL-4, la IL-13 y la IL-10.

De un modo más específico, las citocinas pueden ser clasificadas en base a la función prioritaria que realizan. Así, pueden distinguirse cuatro grupos de citocinas: citocinas estimuladoras del crecimiento y la diferenciación de células hematopoyéticas, citocinas mediadoras de la inmunidad innata, citocinas activadoras de células inflamatorias inespecíficas y citocinas reguladoras de la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos. Las **citocinas estimuladoras del crecimiento y la diferenciación de células hematopoyéticas** pueden ser producidas por células del estroma de médula ósea y por linfocitos T. Presentan un potente efecto estimulador del crecimiento y la diferenciación de progenitores de médula ósea que se convierten en células sanguíneas maduras. Algunos ejemplos de citocinas de esta familia son: el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), la IL-3, la IL-7, la IL-9 y la IL-11. Las **citocinas mediadoras de la inmunidad innata** son producidas por células de tipo fagocitario en respuesta a la presencia de agentes infecciosos. Dentro de este grupo se incluyen, entre otras citocinas, los interferones de tipo I, el TNF y las interleucinas IL-12, IL-6 e IL-1. Por su parte, las **citocinas activadoras de células inflamatorias inespecíficas** son generadas por linfocitos T en respuesta a su antígeno específico, pero desencadenan la activación de respuestas inmunes

inespecíficas. Pertenecen a este grupo de citocinas por ejemplo la IL-5, entre otras. Por último, las **citocinas reguladoras de la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos** son secretadas por linfocitos T en respuesta a la presencia de su antígeno específico. Son las encargadas de “orquestrar” la respuesta inmune adaptativa mediando la activación de la respuesta humoral de los linfocitos B y las respuestas citotóxicas producidas por otros linfocitos T. Algunas de estas citocinas son la IL-2, la IL-15 y la IL-4.

Estas clasificaciones permiten agrupar de un modo más o menos aproximado a las citocinas en base a sus efectos biológicos. No obstante, se debe tener en cuenta que, dada su cualidad pleiotrópica, una misma citocina puede pertenecer a diferentes grupos dentro de una misma clasificación.

3.1.2. Receptores y mecanismos de transducción de señales de citocinas

Las citocinas ejercen su acción mediante la unión a receptores específicos que se localizan en la superficie celular. Estos receptores son proteínas de membrana glicosiladas que permiten la transmisión de la señal de la citocina al interior celular. Constan de una región extracitoplasmática que tiene la capacidad de unirse a la citocina, una región transmembranal y una región citoplasmática, que interviene en la transmisión de señales al interior de la célula. Aunque existen diferentes tipos de receptores, generalmente los receptores funcionales son complejos multicatenarios que presentan una cadena de unión específica de ligando (cadena específica) y una cadena traductora de señales (cadena común), que activa diferentes vías de señalización y que es compartida por otros receptores. En general, la transducción de señales requiere de la unión de varias cadenas específicas (homodimerización) o de la cadena específica con la cadena común (heterodimerización). La dimerización es lo que permite que se forme un receptor funcional de alta afinidad. En algunos casos, puede necesitarse la interacción de tres cadenas para formar un receptor de alta afinidad. De hecho, los receptores de citocinas tienen la cualidad de presentar una muy alta afinidad por sus ligandos, por lo que la secreción de pequeñas cantidades de citocinas es suficiente para que ejerzan su acción. La expresión de los receptores puede ser constitutiva o puede requerir la activación celular previa. Por lo general, la activación celular causa un incremento en el número de receptores expresados en la célula. Aunque puede estar restringida a unos pocos tipos celulares, la distribución celular de los receptores suele ser muy amplia. Esta amplia distribución, junto con este tipo de estructura propia de los receptores, puede explicar las principales características de las citocinas. Los efectos de redundancia se producen ya que muchas citocinas comparten la misma cadena transductora de señales de su receptor, mientras que el pleiotropismo tiene lugar ya que una misma citocina puede desencadenar la activación de diferentes cascadas de señalización. (Bagley *et al.*, 1997; Grötzinger, 2002; Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

La unión de la citocina a su receptor da lugar a la transducción de señales que causa el efecto biológico final. La transducción de señales se refiere a las respuestas bioquímicas intracelulares que tienen lugar después de la unión de un ligando a su receptor. La señal iniciada generalmente consiste en una **fase citosólica inicial** (respuesta primaria), en la que suelen producirse modificaciones en el

receptor y las proteínas que interaccionan con él, que conducen posteriormente a la activación y/o translocación al núcleo de factores de transcripción que se encontraban silenciados en la célula en reposo. Se inicia entonces la **fase nuclear** (respuesta secundaria), en la que los factores de transcripción modulan la expresión génica. En función de los genes que se expresan o se silencian, tienen lugar diversas consecuencias para la célula, tales como la supervivencia celular, la inducción de diferenciación, la adquisición de funciones concretas, la activación de la apoptosis, etc. En el caso de los receptores de citocinas, tras la unión del ligando al receptor, se produce la oligomerización de varias cadenas de receptores, lo que permite el contacto entre las regiones citoplasmáticas causando la activación de los mecanismos de señalización específicos de cada familia de receptores. De modo general, la transducción de señales se produce mediante la fosforilación de proteínas celulares, incluyendo el propio receptor, lo que da lugar a su activación. La fosforilación de proteínas celulares causa a su vez la activación de factores de transcripción que permiten la transcripción de determinados genes, lo que causa el efecto final correspondiente. (Grötzinger, 2002; Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

En función de su estructura, en concreto en base a regiones comunes de homología dentro de los miembros de una misma familia, los receptores pueden ser clasificados en tres familias, cada una de las cuales emplea mecanismos de señalización específicos (Darnay y Aggarwal, 1997; Moutoussamy *et al.*, 1998; Peña, 2003; Langer *et al.*, 2004a; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013a). Brevemente, las características estructurales y los mecanismos de señalización celular específicos de cada familia de receptores son:

❖ Superfamilia de receptores de inmunoglobulinas

Esta familia está formada por receptores que contienen en la región extracitoplasmática un número variable de dominios similares a los de las inmunoglobulinas, mientras que en la región citoplasmática contienen secuencias tirosina cinasa a través de las cuales tiene lugar la transducción de las señales. La señalización de los receptores de la familia de las inmunoglobulinas está mediada por tanto por **actividad tirosina cinasa**. Las secuencias tirosina cinasa citoplasmáticas fosforilan residuos de tirosina del propio receptor y de las proteínas celulares. La fosforilación puede hacerse en más de un sitio, pudiéndose activar vías diferentes, tales como la vía de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*), la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K, del inglés *PhosphoInositide 3 Kinase*), las cinasas de la familia *Src*, etc. El resultado final de la activación de estas vías es la regulación de la transcripción génica de las proteínas implicadas en distintos procesos celulares. Dentro de esta familia se encuentran los receptores de citocinas implicadas en el crecimiento celular, como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR, del inglés *Macrophage Colony- Stimulating Factor Receptor*).

❖ Superfamilia de receptores de citocinas

Esta familia también se ha denominado **familia de receptores de factores de crecimiento hematopoyéticos**. En función de su relación evolutiva, los receptores pertenecientes a esta familia pueden subdividirse en dos grupos:

- ❖ **Receptores de clase 1.** Esta clase de receptores comprende aquellos receptores que presentan en su región extracitoplasmática dos pares de residuos de cisteína conservados en el extremo N-terminal y un motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS, siendo X un aminoácido no conservado) en el extremo carboxiterminal. Su región citoplasmática se caracteriza por la presencia de dos motivos conservados denominados *box1* y *box2*. Estos receptores forman complejos multicatenarios dando lugar generalmente a heterodímeros. Están formados por una o más cadenas específicas de unión a ligando y la cadena de transducción de señales común. En base a la cadena común que presentan, pueden ser clasificados, existiendo subgrupos que contienen cadena gamma común (γ_c), cadena beta común (β_c) o cadena gp130. Pertenecen a esta clase de receptores la mayoría de los receptores de citocinas.
- ❖ **Receptores de clase 2.** Estos receptores, al igual que los receptores de clase 1, presentan en su región extracelular dos residuos conservados de cisteína, pero no contienen motivo WSXWS. Consisten en una cadena polipeptídica de unión a ligando y una cadena transductora de señales. Se incluyen en esta clase los receptores de los interferones y los receptores de algunas citocinas como la IL-10.

La superfamilia de receptores de citocinas media su señalización mediante **actividad Jak y STAT** (Moutoussamy *et al.*, 1998; Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014). La activación del receptor da lugar a cascadas de señalización intracelular que implican la activación de la familia de cinasas Janus (Jak, del inglés *Janus kinase*) y la activación de una familia de factores de transcripción denominada transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*). Tras su activación, las proteínas STATs dimerizan y se translocan al núcleo donde activan la transcripción génica. Ambas familias de proteínas están compuestas por varios miembros. Se ha observado que existe una asociación entre el receptor y las proteínas Jak y STAT que se activan. De manera que, distintas citocinas activan determinadas vías Jak-STAT causando la modulación de la transcripción de diferentes genes (O'Shea y Plenge, 2012). Un ejemplo de receptor que señala mediante esta vía es el receptor de la IL-6 (IL-6R) (Turner *et al.*, 2014).

- ❖ **Familia de receptores de factor de necrosis tumoral**

Pertenecen a esta familia aquellos receptores que presentan en el dominio extracelular tres o cuatro secuencias conservadas ricas en cisteína. Estos receptores se encuentran formando trímeros preformados que sufren un cambio conformacional al unirse a su ligando. La señalización de los receptores de la familia del TNF tiene lugar mediante la **activación de NF κ B**. Está mediada por la activación de factores asociados al receptor de TNF (TRAF, del inglés *TNF Receptor Associated Factor*). Estos receptores interactúan con las proteínas TRAF formando complejos multimoleculares que, en último término, causan la activación del factor de transcripción denominado factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B, del inglés *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), el cual desempeña una función central en la inflamación, la activación linfocitaria y la supervivencia celular (Vallabhapurapu y Karin, 2009). Dentro de esta familia se localizan, por ejemplo, los tres receptores para el TNF α .

A pesar de la existencia de mecanismos de transducción de señales específicos de los distintos grupos de receptores, no existe una especificidad absoluta en relación a los mecanismos de transducción de señales. Además de los mecanismos de señalización específicos, existen mecanismos de transducción de señales que son comunes entre las distintas familias de receptores. De modo que, varios tipos de receptores pueden desencadenar la activación de diversas vías, como la mediada por la activación de cinasas de la familia *Src* o la vía Ras, que causa la activación de la cascada de cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*). Así mismo, dado que una misma citocina puede desencadenar la activación de varias vías de señalización, la señalización es frecuentemente compartida con otras citocinas.

3.1.3. Mecanismos reguladores de citocinas

Tal y como se apunta anteriormente, la acción de las citocinas es clave en la respuesta inmune, presentando efectos biológicos muy numerosos que conciernen a la inmunidad innata y adaptativa. Por ello, los mecanismos reguladores que involucran a las citocinas son cruciales en la regulación de la respuesta inmune. Estos mecanismos reguladores se desarrollan en tres ámbitos. Por un lado, existen moduladores que afectan directamente a las citocinas. Dichos moduladores pueden actuar sobre la síntesis o secreción de las mismas, o pueden modular su actividad. Por otro lado, es posible regular los efectos biológicos de las citocinas mediante la modulación de la expresión de sus receptores. Por último, existen mecanismos moduladores que afectan a las vías de señalización que activan las citocinas.

La **expresión** de las **citocinas** está fuertemente regulada. Generalmente no se producen de forma constitutiva, sino tras la activación celular. Su síntesis está regulada por diversas señales extracelulares que inducen o inhiben su producción. Entre las diferentes señales destaca la presencia de otras citocinas. Es decir, algunas citocinas pueden inducir o modular, potenciando o inhibiendo, la producción de otras, estableciéndose así un mecanismo regulador de la respuesta inmune. De manera que la regulación entre citocinas da lugar a la aparición de efectos sumatorios, sinérgicos o antagónicos. Por otro lado, la presencia de receptores solubles constituye un mecanismo regulador de la **actividad** de las **citocinas**. Además de expresarse como proteínas de membrana, muchos receptores de citocinas pueden ser sintetizados como proteínas solubles. La existencia de estos receptores solubles puede causar varios efectos. El antagonismo constituye el efecto biológico más común. El resultado es la inhibición de la señalización celular. Sin embargo, además de funciones inhibitoras, los receptores solubles pueden presentar funciones potenciadoras facilitando la señalización intracelular en células que no expresan el receptor funcional completo. Conjuntamente con las citocinas, la **expresión** de sus **receptores** también está fuertemente regulada. Las señales reguladoras pueden ser sus propios ligandos u otras citocinas y pueden ser potenciadoras o inhibitoras. Finalmente, los mecanismos reguladores que conciernen a las **vías de señalización** son muy variados dada la diversidad de vías de señalización que pueden activarse. Así mismo, el número de moduladores aumenta ya que son muchas las proteínas y factores implicados en cada vía de señalización. Por ejemplo, la vía Jak-STAT es modulada negativamente por las proteínas supresoras de las señales de

las citocinas (SOCS, del inglés *Suppressors Of Cytokine Signaling*), las tirosina fosfatasas o las proteínas inhibidoras de STAT activado (PIAS, del inglés *Protein Inhibitors of Activated STAT*). (Moutoussamy *et al.*, 1998; Peña, 2003; Levine., 2004; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

3.2. QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son pequeñas moléculas proteicas, pertenecientes a la familia de las citocinas cuyo nombre proviene de “citocinas quimiotácticas”, ya que se caracterizan por poseer propiedades quimioatrayentes. Su característica bioquímica común es la presencia de cuatro residuos de cisteína conservados que se unen formando dos puentes disulfuro, los cuales resultan esenciales para la actividad de la molécula. Son producidas por muchos tipos celulares de diferentes tejidos, como leucocitos, plaquetas, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales y células acinares. Se secretan de forma constitutiva o en respuesta a estímulos exógenos y endógenos, tales como productos bacterianos o citocinas pro-inflamatorias. Dada su actividad quimioatrayente, es muy importante su implicación en la regulación del trasvase de leucocitos hacia los tejidos. Cuando se inicia la respuesta inmune, rápidamente son secretadas para permitir la migración de las células inmunes hacia el foco de inflamación, mediante el establecimiento de gradientes de quimiocina. Ésta constituye su principal función, sin embargo ejercen otras funciones relacionadas con los procesos inflamatorios y con la organización tisular. En relación con la inflamación, además de participar en los procesos quimiotácticos, las quimiocinas son capaces de activar células inmunes como neutrófilos o linfocitos T. En cuanto a sus propiedades pleiotróficas, participan en la maduración celular, la estimulación o represión de la angiogénesis, el desarrollo de órganos linfoides, etc. (Adams y Lloyd, 1997; Baggiolini *et al.*, 1997; Rollins, 1997; Luster, 1998; Rossiy Zlotnik, 2000; Borish y Steinke, 2003; Peña, 2003; Rot y von Andrian, 2004; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2014).

3.2.1. Clasificación de quimiocinas

Clásicamente las quimiocinas se han clasificado en base a su estructura. Estas moléculas presentan una región N-terminal conservada caracterizada por la presencia de dos cisteínas. Esta región sufre modificaciones en función del tipo de quimiocinas. De modo que, dependiendo del número y la localización de los residuos cisteína N-terminales, pueden distinguirse cuatro grupos de quimiocinas: quimiocinas CXC, quimiocinas CC, quimiocinas C y quimiocinas CX₃C. Las **quimiocinas CXC**, también denominadas quimiocinas α , presentan las dos cisteínas N-terminales separadas por un aminoácido, de modo que la secuencia resultante es Cis-X-Cis (siendo X cualquier aminoácido). Por lo general, las quimiocinas pertenecientes a esta familia son potentes quimioatrayentes para los neutrófilos. Forman parte de esta familia por ejemplo la quimiocina CXCL8. Por otro lado, las **quimiocinas CC**, también denominadas quimiocinas β , tienen las dos cisteínas N-terminales adyacentes, es decir, no presentan aminoácido intermedio, por lo que la secuencia resultante es Cis-Cis. Mayoritariamente, las quimiocinas pertenecientes a esta familia están involucradas en la quimioatracción de los monocitos y otros tipos celulares como las células NK y las DCs. Un ejemplo

representativo de esta familia es la quimiocina RANTES o CCL5. Por su parte, las **quimiocinas C**, también conocidas como quimiocinas γ , presentan únicamente una cisteína. Se conocen dos quimiocinas pertenecientes a este grupo, denominadas XCL1 y la XCL2 (del inglés *chemokine C motif Ligand*), cuya principal función es la quimiotaxis de linfocitos T y células NK. Por último, las **quimiocinas CX₃C**, también denominadas quimiocinas δ , presentan tres aminoácidos entre las dos cisteínas N-terminales. Por el momento, únicamente se ha descrito una quimiocina perteneciente a este grupo, denominada CX3CL1 (del inglés, *chemokine C-X3-C motif Ligand 1*), que presenta una función quimioatrayente y actúa también como molécula de adhesión. Posteriormente, las quimiocinas se han clasificado teniendo en cuenta criterios funcionales. De forma general se establecen dos grandes grupos, las quimiocinas implicadas en las reacciones inflamatorias y las quimiocinas que intervienen en organización tisular o quimiocinas homeostáticas. Las **quimiocinas inflamatorias**, aquellas quimiocinas que intervienen en las reacciones inflamatorias, generalmente son producidas de forma inducible, en respuesta a la presencia de estímulos inductores de inflamación. Dada la importancia de su función quimioatrayente, es posible clasificarlas en función del tipo celular principal sobre el que actúan. Así, se distinguen quimiocinas inflamatorias, que presentan capacidad quimioatrayente sobre monocitos y neutrófilos, e inmunoquimiocinas, que tienen capacidad quimioatrayente sobre linfocitos. Por otro lado, las **quimiocinas homeostáticas** participan en funciones pleiotróficas. Se producen de forma constitutiva y suelen expresarse en tejidos y órganos específicos. (Rollins, 1997; Luster, 1998; Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012). Los distintos tipos de quimiocinas estructurales pueden presentar características de diferentes tipos de quimiocinas funcionales. Por ejemplo, existen quimiocinas CXC que pertenecen al grupo funcional de quimiocinas inflamatorias y al grupo de inmunoquimiocinas.

3.2.2. Receptores y mecanismos de transducción de señales de quimiocinas

Los receptores de quimiocinas se caracterizan por presentar una estructura que consta de una región extracelular corta (N-terminal), siete dominios transmembrana muy conservados con tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares, y un extremo citoplasmático corto (C-terminal). Su expresión celular puede ser constitutiva o inducida. El conjunto de receptores de quimiocinas puede ser dividido en dos en función de su especificidad de ligando. Así se distinguen receptores específicos y receptores compartidos. Los **receptores específicos** son aquellos que se unen a un ligando concreto. Pertenece a este grupo, por ejemplo, el receptor para la CXCL8, es decir el receptor de quimiocina tipo C-X-C 1 (CXCR1, del inglés *C-X-C chemokine Receptor 1*). Por otra parte, atañen al grupo de **receptores compartidos** aquellos que tienen capacidad de unión a más de un ligando. Sus ligandos son quimiocinas de un tipo u otro. Un ejemplo de receptor de tipo compartido es el receptor de quimiocina tipo C-C 1 (CCR1, del inglés *C-C chemokine Receptor 1*), que tiene afinidad por quimiocinas de tipo CC.

Los receptores de quimiocinas se encuentran asociados en su extremo carboxiterminal a proteínas de unión con nucleótidos de guanina o proteínas G, por lo que pertenecen al grupo de

receptores denominados receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G Protein-Coupled Receptors*). Al igual que algunos de los receptores para citocinas, estos receptores también presentan la capacidad de homo y heterodimerizar, de manera que no señalizan de forma aislada, sino que forman estructuras complejas. La formación de estas estructuras da lugar a múltiples consecuencias funcionales tales como la modulación de la afinidad de unión al ligando o la activación de diferentes vías de señalización, entre otras, modificando por tanto su farmacología (Muñoz *et al.*, 2012). Las proteínas G son las encargadas de iniciar la transducción de la señal al interior celular mediante la activación de varias enzimas citoplasmáticas, entre ellas la PLC, que da lugar a la activación de la proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*). Estos procesos desencadenan la activación de diferentes cascadas de señalización, como la vía de señalización de las MAPK, lo que finalmente desemboca en la activación de determinados factores de transcripción que modulan la expresión génica. Por otro lado, la activación de las proteínas G estimula cambios en el citoesqueleto y la polimerización de los filamentos de actina y miosina, lo que aumenta la motilidad celular. Además, estas señales cambian la conformación de las integrinas de la superficie celular y aumentan su afinidad hacia sus ligandos. Todo ello contribuye a que se produzca la migración celular. (Baggiolini *et al.*, 1997; Luster, 1998; Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

3.2.3. Mecanismos reguladores de quimiocinas

Las quimiocinas son moléculas altamente inducibles. La inducción de su síntesis puede estar mediada por estímulos inflamatorios o por la presencia de agentes externos que causan daño tisular. Generalmente se producen en respuesta a infecciones bacterianas o virales, que promueven la liberación de estímulos pro-inflamatorios, lipopolisacárido (LPS) o productos bacterianos. A pesar de la variedad de estímulos inductores, normalmente son las propias citocinas pro-inflamatorias las que inducen su secreción. Así, la presencia de IL-1 o IFN γ , entre otras, induce la secreción de quimiocinas en una gran variedad de células. (Peña, 2003; Male *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

BLOQUE II: LINFOCITOS T COLABORADORES

Las células T CD4 son un subgrupo de linfocitos caracterizado, como su propio nombre indica, por la expresión de la molécula de superficie CD4. Se les denomina también linfocitos T colaboradores o *T helper* debido a la gran importancia de su función colaboradora con los linfocitos B en la producción de anticuerpos. No obstante, además de esta colaboración, las células T CD4 desempeñan otras funciones centrales en el SI como el aumento y el mantenimiento de las respuestas de los linfocitos T CD8 y la regulación de la función macrofágica.

La población linfoide T CD4 no es una población celular homogénea, sino que existen diversos subtipos celulares dentro de ella. Los diferentes subtipos de linfocitos Th se clasifican en función de una serie de propiedades definitorias tales como: la producción de citocinas características de cada subtipo, la activación de factores de transcripción concretos, la expresión en membrana de determinadas moléculas de superficie (receptores para citocinas y quimiocinas y moléculas de adhesión), y la presencia de modificaciones epigenéticas en los *loci* de los genes característicos. Estas propiedades definitorias de los linfocitos Th se adquieren durante el proceso de diferenciación, el cual es un proceso dirigido y muy regulado. La diferenciación, dirigida fundamentalmente por las citocinas presentes en el microambiente, da lugar a la aparición de modificaciones epigenéticas y a la activación de la transcripción. De manera que, en función de las citocinas presentes en cada momento, se producen unas u otras modificaciones epigenéticas y se activan determinados factores de transcripción, propios de cada uno de los subgrupos.

Los linfocitos T CD4 naïve producen sobre todo IL-2. Sin embargo, al diferenciarse, son capaces de producir una gran variedad de citocinas. Las citocinas producidas por las distintas subpoblaciones determinan las funciones efectoras que los linfocitos desarrollan. Cada subpoblación produce de forma mayoritaria una citocina que, en varios casos, da nombre a la subpoblación. Esta citocina característica de cada subtipo recibe el nombre de “citocina característica” o “*signature cytokine*”. Sin embargo, a pesar de la existencia de una citocina característica, los linfocitos tienen la capacidad de producir una combinación de varias citocinas. Dada la gran variedad de combinaciones de citocinas producidas, los distintos subgrupos de linfocitos colaboradores dan lugar a respuestas muy diferentes y participan en la defensa contra distintos tipos de agentes infecciosos. A pesar de que son identificables varios subgrupos de células Th, muchos linfocitos producen otras combinaciones diferentes de citocinas o sólo alguna de las citocinas características de cada subpoblación, por lo que no son fáciles de clasificar en poblaciones separadas. Además, existen subpoblaciones que presentan características de dos subgrupos diferentes y subtipos que, una vez diferenciados, presentan plasticidad fenotípica pudiendo transformarse de una población a otra cuando existen cambios en las condiciones de activación.

En suma, la variabilidad celular de los linfocitos T CD4; la complejidad de los procesos de diferenciación; las múltiples funciones que desempeñan; la existencia de heterogeneidad de funciones

en cada subtipo; así como la plasticidad existente entre unas subpoblaciones y otras; hacen de estas células un objeto de estudio muy interesante y con amplias proyecciones tanto en la respuesta inmune como en la aparición de inmunopatología.

1. CLASIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T COLABORADORES

Dentro de los linfocitos T colaboradores se incluyen diferentes tipos de células efectoras involucradas en la defensa frente a una amplia variedad de agentes infecciosos. Por otro lado, otros linfocitos Th muestran propiedades reguladoras, presentando una función moduladora e inhibidora de la respuesta inmune que ajusta la magnitud de la respuesta y controla la aparición de autoinmunidad.

Las primeras evidencias de la existencia de, al menos, dos poblaciones de células T CD4 efectoras fueron apuntadas en 1972 y 1978 por Parish y Liew y Tada *et al.*, respectivamente (Parish y Liew, 1972; Tada *et al.*, 1978). Años después, en 1986 Mosmann y sus colaboradores demostraron que la heterogeneidad funcional en las células T CD4 murinas se debía a la producción de diferentes combinaciones de citocinas (Mosmann *et al.*, 1986), lo cual fue posteriormente confirmado en células T CD4 humanas (Del Prete *et al.*, 1991; Parronchi *et al.*, 1991). Así, las células Th fueron clasificadas en dos subpoblaciones, **Th1** y **Th2**. Unos años más tarde, en 1995, el grupo de Sakaguchi identificó las células **T reguladoras (Treg)**, desarrolladas en el timo y caracterizadas por la expresión en superficie de CD25 y por su función supresora, que permitía evitar la autoinmunidad (Sakaguchi *et al.* 1995; Asano *et al.* 1996). Más tarde, en 2003, Chen y sus colaboradores demostraron la existencia de las células Treg inducibles, al descubrir la conversión de células T naïve en células Treg en la periferia (Chen *et al.* 2003a). Al margen de las células reguladoras, el paradigma de linfocitos efectores Th1/Th2 se mantuvo durante años hasta que, en 2005, un tercer subtipo de células efectoras fue identificado, el subgrupo **Th17** (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Aunque la existencia de la IL-17A (*en adelante IL-17*) como un producto de células T CD4 activadas se conocía desde hacía más de 10 años, el reconocimiento de la presencia de células Th17 como una subpoblación distinta fue posterior. Más recientemente, se han identificado otros subtipos de linfocitos T CD4 cuya existencia como poblaciones Th separadas está aún por determinar. Así, se han definido los linfocitos T colaboradores foliculares (Tfh, del inglés *T follicular helper*) (Schaerli *et al.*, 2000), Th9 (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008a) y Th22 (Eyerich *et al.*, 2009; Trifari *et al.* 2009).

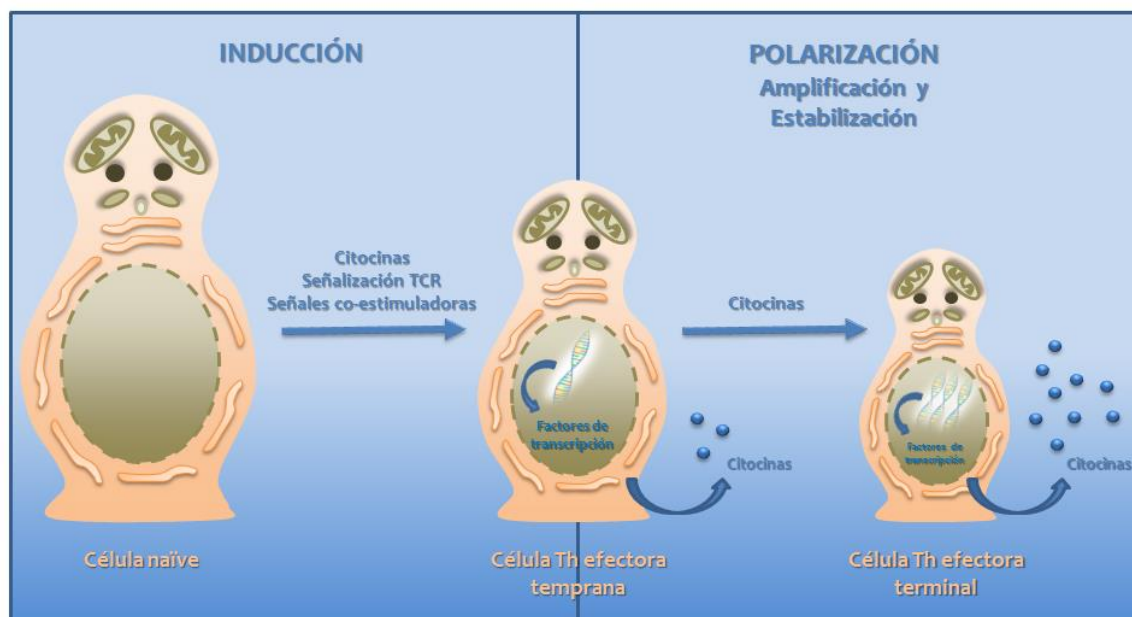
La heterogeneidad de las células Th está ligada al proceso de diferenciación linfoide. La diferenciación de una célula Th es el proceso mediante el cual una célula T CD4 naïve adquiere un fenotipo determinado. La adquisición del fenotipo específico depende del ambiente de citocinas, así como de la concentración de antígeno presentada, el tipo de APCs presentes y la presencia de moléculas co-estimuladoras. Las características concretas del proceso de diferenciación varían dependiendo de cada subpoblación generada. Sin embargo, a pesar de las diferencias, la base del

proceso es muy similar y presenta una serie de propiedades generales comunes. Estas características generales del proceso de diferenciación son:

- ❖ Las APCs y otras células presentes en el lugar de la respuesta inmune producen citocinas que son las principales encargadas de dirigir el desarrollo de los diferentes linajes de linfocitos Th. Aunque diversas señales ambientales influyen en el proceso de diferenciación, el microambiente de citocinas que rodea a la célula naïve es decisivo para la diferenciación celular hacia un fenotipo concreto. Cada linaje requiere de la presencia de determinadas citocinas para su diferenciación.
- ❖ El proceso de diferenciación conlleva la activación de determinados factores de transcripción que activan la transcripción de diversos genes, destacando los genes que codifican para las citocinas que se expresan en las poblaciones diferenciadas. Cada subgrupo se caracteriza por la activación de un factor de transcripción característico que se conoce como *master regulator* o “regulador maestro”. Además, cada subpoblación presenta activados otros factores de transcripción entre los cuales generalmente se encuentra uno o más miembros de la familia de factores de transcripción STAT.
- ❖ La diferenciación implica la aparición de una serie de modificaciones del patrón de expresión génica que afectan a los *loci* de los genes de citocinas características de cada subpoblación, entre las que se encuentran las modificaciones epigenéticas y las modificaciones ejercidas por los miRNAs.
- ❖ Los mecanismos que dan lugar a la diferenciación están fuertemente regulados. Una característica importante de la regulación es la producción de citocinas que promueven el desarrollo de su propia subpoblación e inhiben la diferenciación de otros subgrupos de células Th.

El proceso de diferenciación es un proceso secuencial que se desarrolla en varias fases, a lo largo de las cuales la célula naïve se compromete hacia un linaje concreto (véase *Figura 2*). En primer lugar la diferenciación comienza con la exposición de la célula al antígeno, con la consiguiente estimulación del TCR, así como a las señales co-estimuladoras presentadas junto con el antígeno por las APCs. Esto desencadena la activación de una cascada de señalización celular que da lugar a la activación de determinados factores de transcripción. A esta primera fase se le denomina **fase de inducción** de la diferenciación. Además de la señalización mediada por el TCR, durante esta fase es clave la señalización desencadenada por las citocinas presentes en el microambiente que rodea a la célula naïve cuando tiene lugar el encuentro con el antígeno. Tras la fase de inducción se produce la **fase de polarización** de la diferenciación. Esta fase de polarización es comúnmente denominada fase de amplificación, pero puede subdividirse en una **fase de amplificación** y una **fase de estabilización**. Para que tenga lugar la diferenciación terminal de un subtipo Th no es suficiente con la exposición inicial a las citocinas, sino que es necesaria la presencia de otras citocinas que participan en las fases de amplificación y estabilización de la subpoblación. Finalmente, una vez desarrollada la respuesta inmune, se produce la finalización de la señalización que mantiene la población o su inhibición. De este modo se permite el regreso a la homeostasis y se evita la aparición de patología.

Figura 2. Fases de la diferenciación de las células T colaboradoras.



Nota: Representación esquemática de las diferentes fases que tienen lugar durante la diferenciación linfoide. Modificado de Locksley et al 2009.

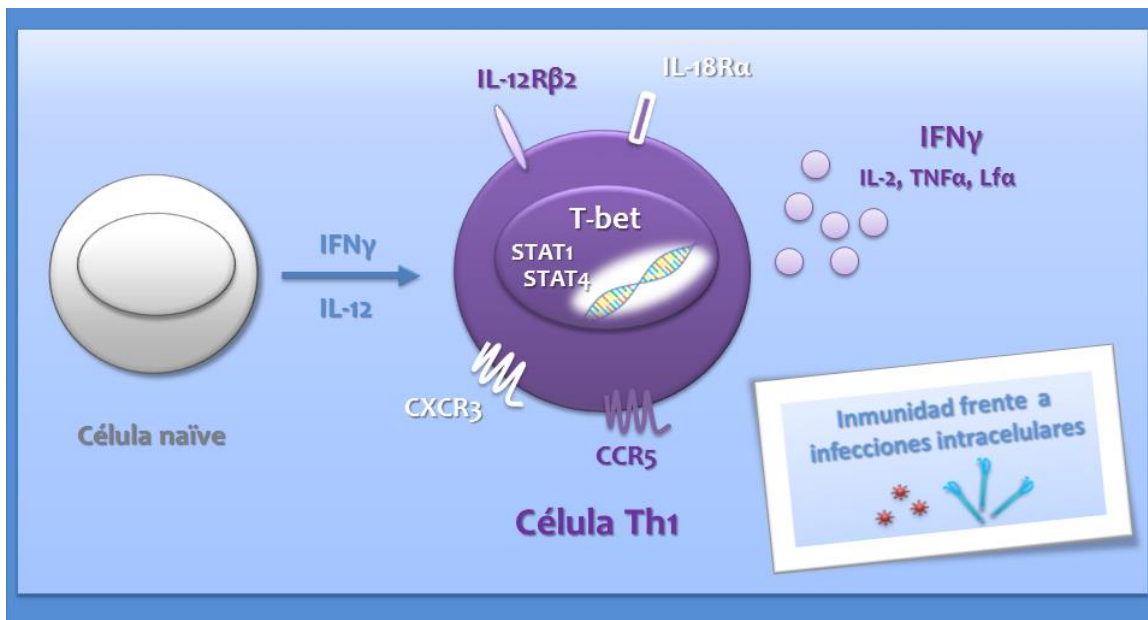
Las características principales de cada uno de los subtipos de linfocitos Th, así como las vías de señalización que tienen lugar en los linfocitos T CD4 naïve durante sus procesos de diferenciación, se resumen brevemente a continuación. Dado que el análisis detallado acerca de las células Th17 comprende uno de los objetivos claves de la presente tesis, la descripción de sus características, diferenciación, función, así como su implicación en patología, se desarrollará ampliamente en posteriores bloques (véase *Bloque III* y *Apartado 4 del Bloque V, Introducción*).

1.1. CARACTERÍSTICAS Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th1

Los linfocitos Th1, se encargan principalmente de la respuesta inmune desencadenada frente a infecciones intracelulares como las causadas por micobacterias y las infecciones virales (véase *Figura 3*). Su función efectora se desempeña gracias a la producción de citocinas características. Especialmente, estos linfocitos producen la citocina IFN γ (también denominada IFN de tipo II), la cual media la activación macrofágica, lo que conduce a la eliminación de patógenos intracelulares (Murray *et al.*, 1985). Además de IFN γ , las células Th1 producen otras citocinas tales como IL-2, TNF α y linfotóxina α (L α). La IL-2 desempeña un papel importante como factor inductor de crecimiento de células T CD8 (Luckheeram *et al.*, 2012). Esta activación de los CTLs, junto con la secreción de IFN γ , da lugar a la protección frente a infecciones virales. Por su parte, la citocina TNF α colabora junto con IFN γ en la activación macrofágica (Liew *et al.*, 1990). Finalmente, la expresión de L α se ha asociado a numerosas acciones biológicas, pero destaca su capacidad de inducción de apoptosis (Etemadi *et al.*, 2013). En cuanto a la colaboración con los linfocitos B, las células Th1 murinas promueven la producción de anticuerpos de tipo inmunoglobulina G2a (IgG2a), lo cual está asociado a la neutralización vírica (Walsh y Mills, 2013).

La diferenciación de los linfocitos Th1 es dirigida fundamentalmente por las citocinas IL-12 e IFN γ y está mediada por la expresión de los factores de transcripción T-bet (también denominado factor de transcripción de unión a caja 21, Tbx21, del inglés *T-box transcription factor*), STAT1 y STAT4. El proceso comienza gracias a la IL-12 producida por las APCs activadas, la cual induce la diferenciación hacia la subpoblación Th1 mediante su acción sobre las células NK y T. Esta citocina activa las células NK para producir IFN γ (Zhu y Paul, 2008), el cual activa el factor de transcripción STAT1 en las células T CD4 naïve activadas e induce el aumento de expresión de T-bet (Afkarian *et al.*, 2002). El factor de transcripción T-bet a su vez induce la producción de IFN γ en la propia célula (Szabo *et al.*, 2000) y la sobre-expresión de la subunidad IL-12R β 2 del receptor de la IL-12 (Mullen *et al.*, 2001). De este modo las células pueden responder a la IL-12 secretada por las APCs. Sobre las células T CD4, la IL-12 induce la activación de STAT4 que da lugar a la inducción de una mayor producción de IFN γ y a la expresión sostenida de IL-12R β 2 (Zhu *et al.*, 2010). De este modo la colaboración entre IFN γ e IL-12 induce a la diferenciación terminal de la subpoblación Th1.

Figura 3. Características y diferenciación de las células Th1.



Nota: Representación esquemática de la diferenciación, las principales características y la función de los linfocitos Th1.

Una vez diferenciadas, las células Th, además de caracterizarse por la secreción de citocinas se identifican por expresar en su membrana determinados receptores de citocinas y quimiocinas. En el caso de las células Th1 expresan en la membrana las subunidades señalizadoras de los receptores para las citocinas IL-12 e IL-18, es decir, IL-12R β 2 e IL-18R α respectivamente (Zhu y Paul, 2008), así como los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 (Bonecchi *et al.*, 1998).

Independientemente de la función protectora de estas células, son muchas las enfermedades que se han asociado a este subtipo de linfocitos T CD4, tales como la psoriasis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide (AR), el síndrome de Sjögren, la diabetes autoinmune o

diabetes tipo 1 (T1D, del inglés *Type 1 Diabetes*), etc (Kagami *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Ishigame *et al.*, 2013; Karabiyik *et al.*, 2013; Lowther *et al.*, 2013; Zorzi *et al.*, 2013).

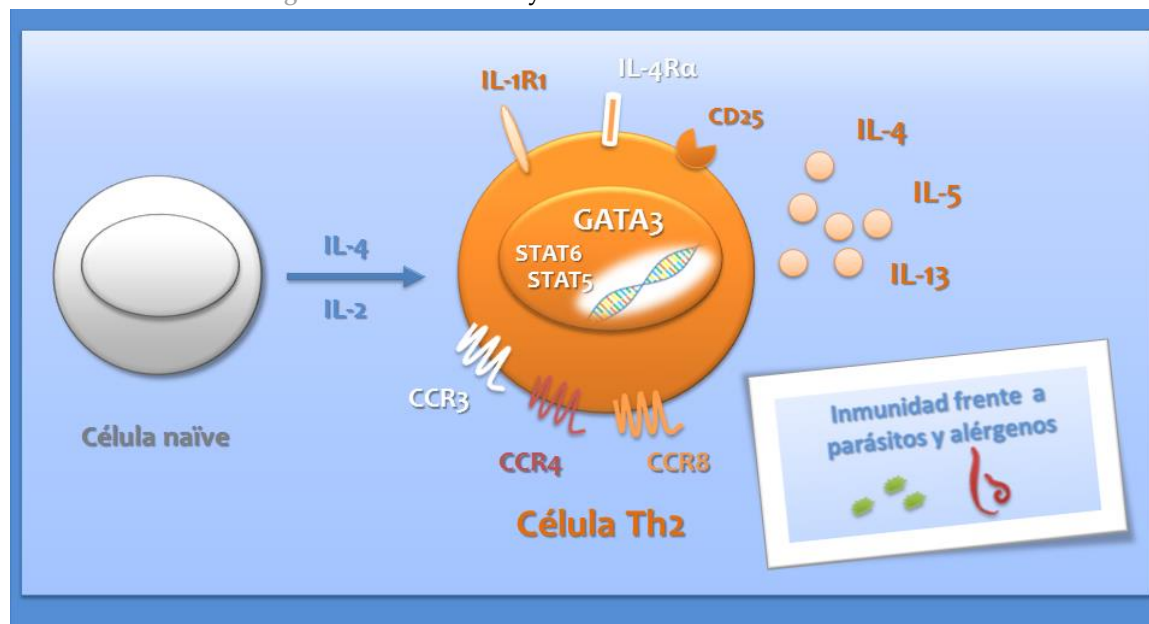
1.2. CARACTERÍSTICAS Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th2

Los linfocitos Th2 participan en la respuesta inmune producida frente a parásitos y alérgenos, estimulando las reacciones mediadas por la IgE y el eosinófilo (Allen y Maizels, 2011) (véase Figura 4). Estas células secretan IL-4, IL-5 e IL-13 que actúan juntas para erradicar las infecciones helmínticas, pero además producen otras citocinas tales como IL-9 e IL-25. La IL-4 y la IL-13 son las principales mediadoras de la respuesta inmune alérgica, induciendo en los linfocitos B el cambio de isotipo de anticuerpo de IgG1 a IgE (Annunziato y Romagnani, 2009). La IL-5, por su parte, principalmente actúa sobre los eosinófilos promoviendo su diferenciación, proliferación, activación y adhesión e inhibiendo su apoptosis (Yamaguchi *et al.*, 1988; Walsh *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1991). Asimismo, la IL-9 y la IL-25 contribuyen a la respuesta desarrollada frente a infecciones causadas por helmintos (Faulkner *et al.*, 1998; Fort *et al.*, 2001).

Las citocinas IL-4 e IL-2 son críticas para la diferenciación del subtipo Th2, mientras que el factor de transcripción característico de esta subpoblación es el factor denominado proteína 3 de unión a GATA (GATA3). Además de dicho factor de transcripción, dentro de la familia de los STAT, la activación de STAT6 y STAT5 es clave para la diferenciación de las células Th2. El proceso de diferenciación comienza mediante la inducción de la activación del factor de transcripción STAT6 a través de la señalización mediada por la IL-4, lo que desemboca en la expresión de GATA3 (Zeng, 2013), el cual aumenta la producción de las citocinas características del subtipo, IL-4, IL-5 e IL-13 (Zhu *et al.*, 2006). Sin embargo, GATA3 no es capaz por sí solo de regular la expresión de todos los genes específicos del linaje Th2, sino que necesita de la colaboración de otros factores como el factor de crecimiento independiente 1 (Gfi-1, del inglés *Growth factor independent-1*) o factores de transcripción de la familia STAT. De una parte, Gfi-1 promueve la expansión de los linfocitos Th2 (Zhu *et al.*, 2006). Por otra parte, STAT3 actúa cooperando con STAT6, permitiendo la correcta interacción de éste con los *loci* (Stritesky *et al.*, 2011). La colaboración de STAT5 con GATA3 es necesaria para conseguir la diferenciación terminal de las células Th2, ya que GATA3 por sí sólo no induce la producción de IL-4 que se encarga de conducir la fase de amplificación de la diferenciación (Zhu *et al.*, 2006).

Tras diferenciarse, los linfocitos Th2 se caracterizan por presentar en membrana una alta expresión de los receptores para las citocinas IL-4, IL-2 e IL-33, es decir, IL-4R α , CD25 o IL-2R α y T1/ST2 o IL-1R tipo 1 (IL-1R1), respectivamente. Los receptores de quimiocinas que expresan mayoritariamente son CCR3, CCR4 y CCR8 (D'Ambrosio *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998).

Figura 4. Características y diferenciación de las células Th2.



Nota: Representación esquemática de la diferenciación, las principales características y la función de los linfocitos Th2.

Si bien los linfocitos Th2 ejercen una función protectora frente a los alérgenos, su sobreactivación se ha asociado al desarrollo de asma y enfermedades alérgicas, aunque también se han visto asociados con otras enfermedades tales como la colitis ulcerosa (Danese y Fiocchi, 2011; Kudo *et al.*, 2013; Romeo *et al.*, 2014).

1.3. CARACTERÍSTICAS Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES

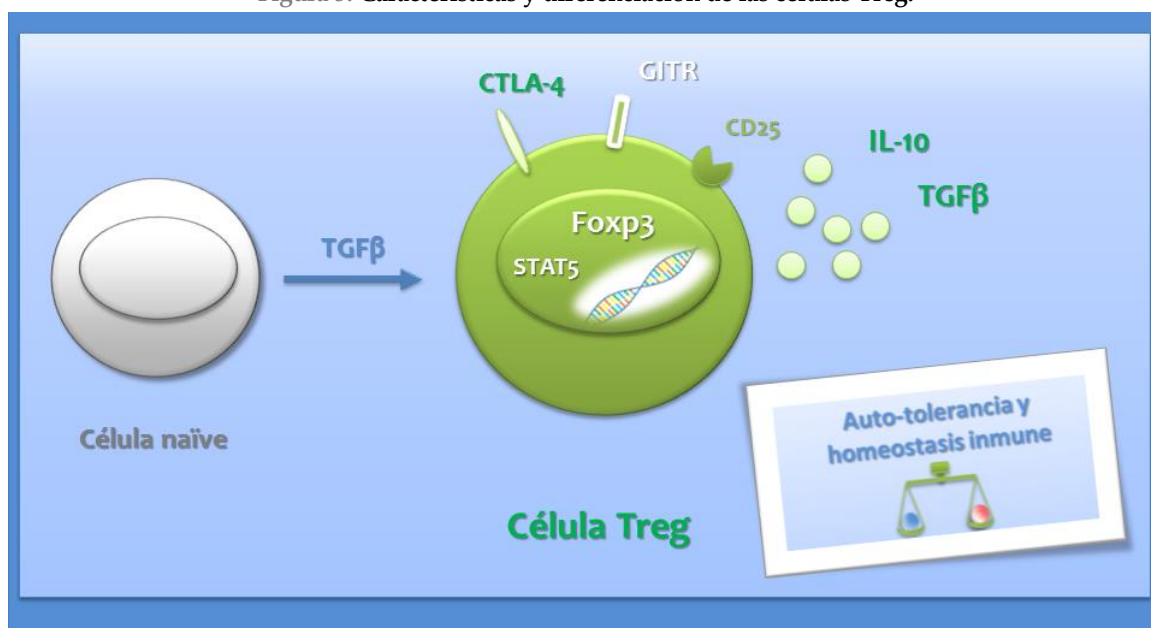
Los linfocitos T reguladores son los responsables de mantener la homeostasis inmune (véase Figura 5). Se caracterizan por presentar actividad supresora sobre otras células inmunes, incluyendo APCs y células T CD4, T CD8, NK, B y linfocitos T citolíticos naturales (NKTs, del inglés *Natural Killer T cells*). Limitan el grado de activación inmunitaria, regulando la inmunidad frente a infecciones virales, bacterianas y parasitarias. Asimismo, estos linfocitos están involucrados en la modulación de las respuestas inmunes dirigidas frente a tumores y en el mantenimiento de la tolerancia frente a tejidos trasplantados y de la tolerancia materno-fetal. Dada su función supresora se caracterizan por prevenir la aparición de reacciones autoinmunes, así como la inmunopatología y la alergia. Las principales citocinas que secretan los linfocitos Treg son IL-10, el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$, del inglés *Transforming Growth Factor beta*) e IL-35. Se trata de citocinas comúnmente conocidas por su capacidad inhibidora sobre la respuesta inflamatoria, lo que las hace fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis inmune. En cuanto a la colaboración con los linfocitos B, las células Treg median acciones tanto inmunosupresoras como inmunoestimuladoras a través de la secreción de $TGF\beta$, ya que inhiben la secreción de IgM, IgG1, IgG2 e IgG3 pero inducen la secreción de IgA e IgG2b por parte de las células B (Corthay, 2009).

La población de células Treg puede clasificarse atendiendo al lugar de desarrollo de las células, distinguiéndose dos grupos principales: los linfocitos Treg naturales y los linfocitos Treg inducidos.

Los **linfocitos Treg naturales** (nTreg) provienen de linfocitos T CD4 naïve que se comprometen hacia una actividad reguladora en el timo. Mientras que los **linfocitos Treg adaptativos o inducidos** (iTreg) proceden de linfocitos T CD4 naïve que se diferencian hacia células Treg en la periferia. A su vez, constituyen un grupo heterogéneo que incluye varios subtipos que presentan diferentes fenotipos y propiedades.

En la diferenciación de los linfocitos iTreg, TGF β es la citocina crítica responsable y el factor de transcripción denominado *Forkhead box protein 3* (Foxp3) constituye el *master regulator* específico de linaje (Chen *et al.*, 2003a; Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003). Además de Foxp3, otros factores de transcripción están involucrados en la diferenciación de este subtipo de células Th, tales como los factores de transcripción de la familia Smad y la proteína STAT5. El proceso de diferenciación comienza a través de la señalización de TGF β , la cual desemboca en la inducción de la expresión de Foxp3 (Chen *et al.*, 2003a). La vía de señalización de esta citocina da lugar a la activación de los factores de transcripción Smad. Las proteínas Smad2 y Smad3 son fosforiladas y activadas directamente por el receptor de TGF β , tras lo cual forman heterodímeros con Smad4 y se translocan al núcleo donde potencian la expresión de Foxp3 (Takimoto *et al.*, 2010). Por otro lado, esta expresión de Foxp3 se incrementa aún más gracias a la acción de la IL-2 que media la activación de STAT5, la cual potencia la expresión de Foxp3 (Burchill *et al.*, 2007).

Figura 5. Características y diferenciación de las células Treg.



Nota: Representación esquemática de la diferenciación, las principales características y la función de los linfocitos Treg.

Una vez diferenciadas, los altos niveles de expresión del marcador de superficie CD25 caracterizan a las células Treg (Sakaguchi *et al.*, 1995). Así mismo, expresan en membrana el marcador antígeno 4 asociado a linfocito citotóxico o CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen*) y el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR, del inglés *Glucocorticoid-Induced TNF Receptor family related gene*) (Takahashi *et al.*, 2000; McHugh *et al.*, 2002). En cuanto a los receptores de quimiocinas, las células Treg pueden presentar múltiples receptores en su superficie. Campbell y Koch

proponen que los distintos quimiorreceptores se asocian a la diferente distribución tisular y/o función de los linfocitos Treg (Campbell y Koch, 2011).

Al contrario que en el caso de las células Th efectoras, cuya respuesta exacerbada se asocia a la aparición de numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, en el caso de las células Treg es su déficit el que se asocia a autoinmunidad, inmunopatología y alergia. Muchos estudios han mostrado la asociación entre el número y/o función reducidos de células Treg y la aparición de numerosas enfermedades autoinmunes, incluyendo AR (Ehrenstein *et al.*, 2004), T1D (Lindley *et al.*, 2005), esclerosis múltiple (Viglietta *et al.*, 2004) y lupus eritematoso sistémico (Horwitz, 2008), entre otras. Sin embargo, su presencia también ha sido relacionada con enfermedad. Tal es el caso de los procesos tumorales, en los que la presencia de Treg se ha asociado con la obstaculización del desarrollo de la respuesta inmune efectiva frente a las células tumorales (Yamaguchi y Sakaguchi, 2006).

1.4. CARACTERÍSTICAS Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th17

La subpoblación Th17 ha sido descrita recientemente y su presencia se ha asociado al desarrollo de diversas patologías. Su estudio es de gran actualidad científica y, a pesar de los numerosos avances, aún quedan muchos aspectos de esta subpoblación por definir. El análisis detallado acerca de las células Th17 comprende uno de los objetivos claves de la presente tesis, por lo que se desarrollará ampliamente con posterioridad (véanse *Bloques III y V* de la *Introducción*).

De forma resumida, cabe destacar que los linfocitos Th17 se encargan de la respuesta inmune desarrollada en la presencia de hongos y bacterias extracelulares fundamentalmente a través del reclutamiento de leucocitos, especialmente neutrófilos, en los lugares de infección. Esta subpoblación produce varias citocinas, siendo la más destacada la IL-17, que media la mayoría de sus acciones. También, las citocinas IL-17F, IL-21 e IL-22 son características de estos linfocitos.

La diferenciación Th17 se estimula en presencia de la combinación de varias citocinas pro-inflamatorias producidas en respuesta a la infección. A diferencia de los procesos de diferenciación de otros linfocitos Th efectores (Th1 y Th2) los cuales están bastante bien descritos, en el caso de la subpoblación Th17 existen ciertas controversias en relación a las citocinas involucradas en la diferenciación. No obstante, de modo general, las citocinas principalmente involucradas, en mayor o menor medida, en la diferenciación del linaje Th17 son TGF β , IL-6, IL-1 β , IL-21 e IL-23. La diferenciación de esta subpoblación se produce gracias a la expresión de los factores de transcripción denominados receptores huérfanos relacionados con el receptor de ácido retinoico (ROR, del inglés *Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor*) de tipo γ t y tipo α , así como STAT3, siendo ROR γ t el factor de transcripción conocido como *master regulator*.

Una vez diferenciados, los linfocitos Th17 se caracterizan por expresar altos niveles del receptor de IL-23, IL-23R, entre otros receptores de citocinas, y de CCR6, entre otros quimiorreceptores.

A pesar de su función protectora frente a infecciones, desde su descubrimiento, las células Th17 se han visto involucradas en una gran variedad de patologías inflamatorias y autoinmunes tales como AR, psoriasis, esclerosis múltiple, T1D, etc.

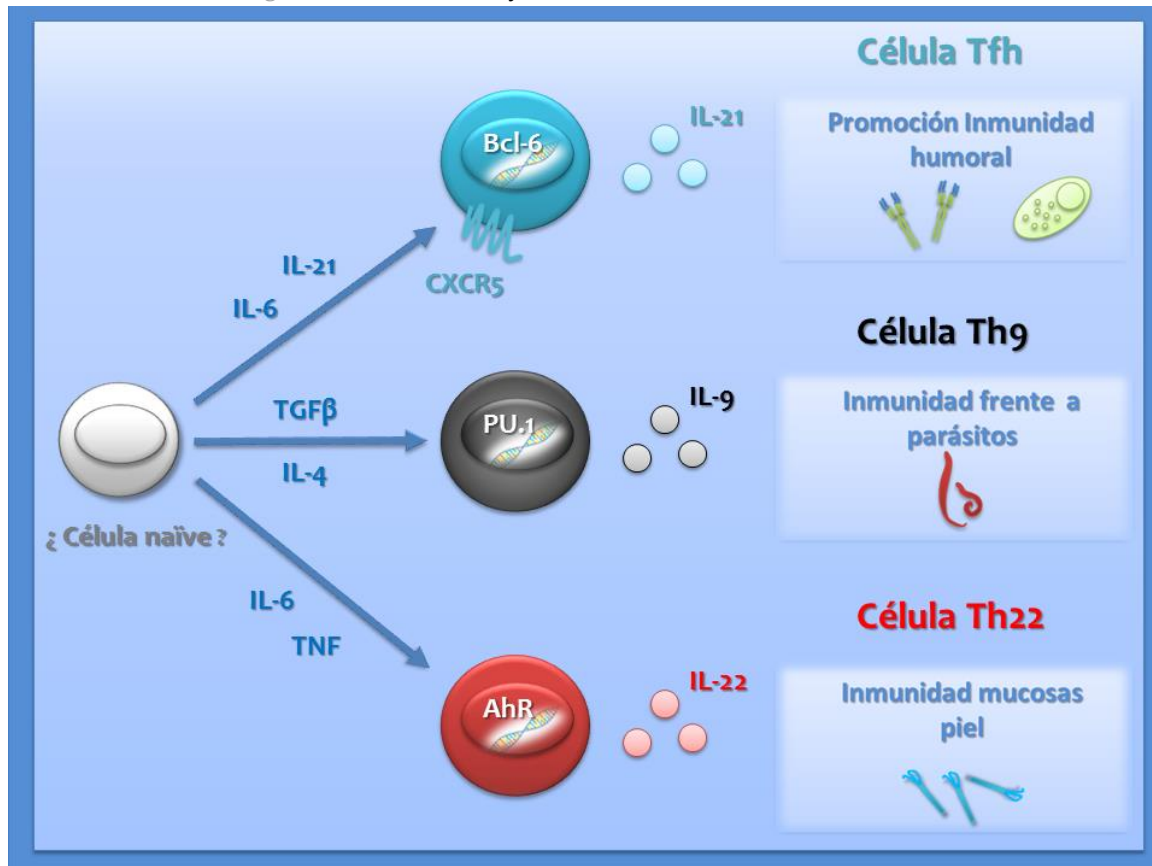
1.5. CARACTERÍSTICAS Y DIFERENCIACIÓN DE OTROS LINFOCITOS Th

En los últimos años, se está procurando caracterizar otros posibles subtipos de linfocitos T CD4 diferentes a las subpoblaciones mejor conocidas (véase *Figura 6*). Uno de estos subtipos lo constituyen las células Tfh, caracterizados por su expresión en membrana del receptor CXCR5 (Breitfeld *et al.*, 2000; Schaerli *et al.*, 2000). Estos linfocitos son las principales células Th presentes en los folículos linfoides y ejercen funciones relacionadas con el desarrollo del centro germinal y la generación de células plasmáticas y células B memoria, presentando una función importante en la activación de la inmunidad humoral (Crotty, 2011; Cannons *et al.*, 2013). Los linfocitos Tfh presentan una gran relación con otros subtipos. Muestran expresión de factores de transcripción relacionados con otros linfocitos Th, así como producción de diversas citocinas relacionadas con otras subpoblaciones linfoides (Cannons *et al.*, 2013). Por otro lado, todas las células T CD4 tienen capacidad de migrar a las regiones foliculares. Además, se sabe que se trata de células Th con una gran plasticidad hacia otros fenotipos linfoides (Crotty, 2011; Cannons *et al.*, 2013). Todo ello hace que la existencia de estas células como un nuevo linaje separado del resto de subpoblaciones Th sea aún cuestionable. Algunos autores han sugerido la posibilidad de que se trate de un estado “camaleónico” de otras células Th adquirido en la región folicular (Murphy y Stockinger, 2010). Los linfocitos Tfh se diferencian en presencia de IL-6 e IL-21 (Nurieva *et al.*, 2008; Vogelzang *et al.*, 2008). La proteína 6 del linfoma de células B (Bcl-6, del inglés *B-cell lymphoma 6*) es el factor de transcripción característico de estos linfocitos (Nurieva *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009), el cual se activa mediante la señalización de ambas citocinas a través de la activación del factor de transcripción STAT3 (Nurieva *et al.*, 2008). Una vez diferenciada, esta subpoblación produce abundantes cantidades de IL-21 (Nurieva *et al.*, 2008). Sin embargo, estas células también son capaces de producir otras citocinas. De acuerdo con ello, Fazilleau y sus colaboradores clasifican los linfocitos Tfh en: Tfh1, que secreta IFN γ y promueve la producción de IgG2a; Tfh2, que secreta IL-4 favoreciendo la producción de IgG1 e IgE; y Tfh10 que secreta IL-10 y promueve la secreción de IgA (Fazilleau *et al.*, 2009).

Otra subpoblación muy recientemente caracterizada la integran los linfocitos Th9. Se trata de un subtipo fuertemente relacionado con la subpoblación Th2, la cual, en presencia de TGF β , se re-diferencia hacia células productoras de IL-9 (Veldhoen *et al.*, 2008a). Estas células se generan gracias a la acción de TGF β e IL-4 (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008a) y se ha propuesto que el factor de transcripción *SFFV proviral integration 1* o PU.1 es su principal factor requerido durante la diferenciación (Chang *et al.*, 2010). Además, se ha mostrado que el factor regulador de interferón 4 (IRF4, del inglés *Interferon Regulatory Factor*) también está implicado en la diferenciación de estas células (Staudt *et al.*, 2010). Los linfocitos Th9 se caracterizan, como su propio nombre indica, por la producción de IL-9 y están involucrados en la defensa frente a infecciones causadas por helmintos,

aunque también se han asociado con inflamación alérgica crónica (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008a; Chang *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2012; Kerzerho *et al.*, 2013; Licona-Limón *et al.*, 2013).

Figura 6. Características y diferenciación de otros linfocitos Th.



Nota: Representación esquemática de la diferenciación, las principales características y la función de los linfocitos Tfh, Th9 y Th22.

Recientemente, se ha descrito otro subtipo de linfocitos Th característico de la piel y definido por la producción de IL-22 y TNF α , la subpoblación Th22 (Eyerich *et al.*, 2009). Sin embargo, aún hoy la existencia de esta población como un linaje separado está puesta en entredicho dado que la IL-22 es producida por otras células, especialmente los linfocitos Th17. Duhen y sus colaboradores han mostrado que los linfocitos Th22 se diferencian mediante la estimulación de los linfocitos T naïve en presencia de DCs plasmacitoides de manera dependiente de IL-6 y TNF (Duhen *et al.*, 2009). Esta diferenciación parece ser dependiente del factor de transcripción denominado receptor de aril hidrocarburos (AhR, del inglés *Aryl hydrocarbon Receptor*) (Trifari *et al.*, 2009). La función de estas células es importante para el mantenimiento de la homeostasis en la piel, siendo un importante componente en la defensa antimicrobiana de las mucosas (Duhen *et al.*, 2009). Sin embargo, también se han asociado a la aparición de numerosas patologías dérmicas, tales como psoriasis, dermatitis atópica y dermatitis de contacto (Fujita, 2013).

1.6. MODIFICACIONES DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th

Durante el proceso de diferenciación de los linfocitos Th tienen lugar diversas modificaciones del patrón de expresión génica, tanto transcripcionales como y post-transcripcionales. Las diversas modificaciones forman parte de un proceso de regulación que es altamente dinámico y que presenta las características claves de heredabilidad y especificidad de tejido.

Las **modificaciones epigenéticas** forman parte de la remodelación de la cromatina que se produce a lo largo de la diferenciación linfoide. El término *epigenética* fue acuñado por primera por Waddington para describir los cambios hereditarios, en el fenotipo o en la expresión génica, que se producen sin que tengan lugar modificaciones en la secuencia del ADN. Dada la estructura fuertemente compactada de la cromatina, muchas regiones del ADN quedan inaccesibles para la maquinaria transcripcional. De modo que, la remodelación estructural de los *loci* se convierte en un prerequisite para la transcripción de muchos genes (Janson *et al.*, 2009). Las modificaciones que permiten esta remodelación constituyen la base de la epigenética. La regulación epigenética incluye modificaciones del ADN y modificaciones de histonas. La recolocación estructural del nucleosoma, las modificaciones post-translacionales de las histonas y las metilaciones de dinucleótidos CpG constituyen los principales tipos de modificaciones de la cromatina (Janson *et al.*, 2009). Las modificaciones más comunes de las histonas son la acetilación y la metilación. La acetilación se asocia con activación de la transcripción, mientras que la metilación se asocia con activación o represión en función del lugar en el que se localiza el grupo metilo (Janson *et al.*, 2009). Existen muchas modificaciones de histonas diferentes. Destacan la trimetilación de la histona 3 en la posición 4 y 27 (H3K4m3 y H3K27m3, respectivamente) que se asocian con activación y represión de la cromatina, respectivamente. Por su parte, la metilación del ADN ocurre predominantemente sobre dinucleótidos CpG, que normalmente se encuentran en regiones conservadas del ADN, y se asocia con represión transcripcional (Janson *et al.*, 2009).

En células T CD4 se han descrito diferentes modificaciones epigenéticas que implican activación o represión génica, asociadas a distintas regiones genómicas tales como promotores, regiones transcritas, *enhancers* o *insulators* (Hirahara *et al.*, 2011). Durante el proceso de diferenciación de las células naïve hacia un fenotipo concreto se producen diversas modificaciones epigenéticas que conllevan la activación de los genes específicos de linaje y la represión de genes específicos de otros linajes. La activación o represión de los genes tiene lugar gracias a que los cambios epigenéticos se producen de forma que los genes característicos del subgrupo se vuelven más accesibles para la maquinaria transcripcional y los genes característicos de otros subgrupos se vuelven inaccesibles. Generalmente estas modificaciones consisten en hiperacetilaciones, metilaciones o desmetilaciones (Janson *et al.*, 2009) que tienen lugar mediante la señalización activada por el TCR y las citocinas presentes en el ambiente local. Estas señales controlan activamente y modifican la expresión génica en los diferentes linfocitos Th. Ello se produce debido a la activación de cascadas de señalización que

provocan la activación de *master regulators* y otros factores de transcripción como los STATs, que poseen habilidad para inducir remodelaciones en la cromatina a través de sus regiones de unión al ADN (Janson y Winquist, 2011). De manera que, en respuesta a dichos factores de transcripción, aparecen lugares de hipersensibilidad del ADN a la acción de las enzimas que llevan a cabo las modificaciones (Janson *et al.*, 2009). Estos cambios epigenéticos aseguran que cada subgrupo produzca sólo un grupo característico de citocinas comprometiéndose progresivamente en una vía específica. Se han descrito modificaciones epigenéticas en Th1, Th2, iTreg y Th17. En cada una de las subpoblaciones diferenciadas estas modificaciones se asocian con cambios hereditarios en sus genes clave (Zhu y Paul, 2008). Las modificaciones epigenéticas más estudiadas conciernen al locus *Ifng*, al locus *Th2* que comprende la información génica *IL-4*, *IL-5* e *IL-13*, al locus *Foxp3* y al loci que comprende los genes *IL-17a* e *IL-17f* (Akimzhanov *et al.*, 2007).

Por otra parte, junto con las modificaciones transcripcionales, el patrón de expresión génica puede verse modificado por la presencia de distintos ARNs que influyen en el proceso de diferenciación linfoide. Recientemente descrita, la existencia de micro ARNs (miRNAs) y ARN largo no codificante (lcnRNA, del inglés *long non-coding RNA*) supone otro punto de control sobre la expresión génica (Orom *et al.*, 2010; Pagani *et al.*, 2013). Los últimos trabajos destacan la importancia de la regulación de la diferenciación mediada por **miRNAs**. Se ha descrito que estas moléculas son moduladores claves del desarrollo y función del SI y que regulan importantes aspectos de la diferenciación de los linfocitos Th (Hoefig y Heissmeyer, 2008; Xiao y Rajewsky, 2009; Jeker y Bluestone, 2010; O'Connell *et al.*, 2010; Belver *et al.*, 2011). Se sabe que los miRNAs modulan la activación linfoide mediante la regulación de la cascada de señalización inducida por el TCR; regulan la supervivencia y la proliferación linfoide; modulan la diferenciación de células Th; y regulan las funciones efectoras de los linfocitos Th (Baumjohann y Ansel, 2013). Se ha mostrado que en cada subpoblación Th existe una expresión diferente de miRNAs, lo que sugiere que cada miRNA puede relacionarse con funciones distintas de las subpoblaciones (Nakayamada *et al.*, 2012; Pagani *et al.*, 2013). Numerosos ejemplos se citan en la bibliografía asociados a cada uno de los fenotipos Th, así como a distintas de las funciones anteriormente mencionadas. Así, por ejemplo, miR-29a es conocido por su función inhibidora sobre la diferenciación de las células Th1, así como su expresión de IFN γ (Steiner *et al.*, 2011). Sin embargo, miR-21 incrementa la diferenciación de los linfocitos Th2 (Sawant *et al.*, 2013). De modo similar, miR-326 potencia la diferenciación del subtipo celular Th17 (Du *et al.*, 2009). Por otra parte, miR-146a es importante para la función supresora de las células Treg (Lu *et al.*, 2010).

1.7. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS Th

Los procesos de diferenciación de los linfocitos Th son procesos fuertemente regulados. Existen mecanismos de regulación tanto positiva como negativa. Los más destacados se refieren a los procesos de amplificación y a la regulación cruzada entre poblaciones.

1.7.1. Mecanismos de amplificación de la diferenciación de linfocitos Th

Comúnmente, las citocinas producidas por una subpoblación promueven el desarrollo del subgrupo propio a la vez que inhiben la diferenciación hacia otros subtipos Th. Este mecanismo de amplificación de la diferenciación permite que una subpoblación de células T CD4 se active primordialmente en una respuesta inmune frente a un agente infeccioso concreto. Por ello, el efecto general de las respuestas inmunes, especialmente las crónicas, es la dominancia de una de las subpoblaciones.

Cada linaje puede producir una citocina capaz de promover la propia diferenciación, causando un bucle de retroalimentación positiva en el proceso de diferenciación. En el caso de los linfocitos Th1, la citocina amplificadora es el IFN γ . La amplificación y estabilización de esta población tienen lugar gracias a la acción de las citocinas IL-12 e IL-18 en estadios tardíos de la diferenciación, cuando la célula efectora expresa los receptores para ambas citocinas. A través de la vía IL-12/STAT4, se sobreexpresa el receptor IL-18R α . De esta manera la IL-18 puede actuar junto con la IL-12 para estimular la producción de IFN γ de manera independiente de la activación del TCR (Yang *et al.*, 2001). Esto genera una vía de amplificación de la respuesta de tipo Th1. Por su parte, en el estadio tardío de la diferenciación de los linfocitos Th2, la IL-33 causa la producción de IL-13 de modo independiente de la señalización del TCR (Guo *et al.*, 2009). El mecanismo de amplificación es el siguiente: la IL-33, vía STAT5, induce la expresión de GATA3, el cual a su vez estimula la expresión del propio receptor de la IL-33, amplificándose aún más la respuesta a la citocina. Por otro lado, las células Treg, además de responder a la señalización mediada por TGF β , son buenas productoras de esta citocina, por lo que se ha propuesto que TGF β es auto-inductora de la diferenciación de estos linfocitos (Park *et al.*, 2004). Finalmente, en el caso del subtipo Th17, al igual que para las subpoblaciones Th1 y Th2, también ha sido propuesto un miembro de la familia de citocinas de la IL-1 como citocina amplificadora a través de una vía independiente del TCR, la IL-1 β . Esta citocina induce, mediante la activación de STAT3, la producción de IL-17A en células Th17 (Guo *et al.*, 2009). Sin embargo, la citocina amplificadora más destacada para esta subpoblación es la IL-21 (Nurieva *et al.*, 2007; Korn *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007). Esta interleucina amplifica su propia expresión, contribuye a la producción de IL-17 y promueve la expresión del receptor de la IL-23, la cual estabiliza la población Th17. Así, la IL-21 desempeña una función clave en la retroalimentación positiva facilitando la inducción *de novo*, la expansión y la estabilización de la subpoblación Th17 (véase *Bloque III*).

Sumada a la acción amplificadora de las citocinas, los factores de transcripción propios de cada uno de los linajes también pueden actuar como amplificadores de la propia diferenciación. En el caso de los linfocitos Th1, se sabe que T-bet puede inducir su propia expresión, tanto directa (Mullen *et al.*, 2001) como indirectamente (Afkarian *et al.*, 2002). Análogamente, GATA3 presenta la capacidad de auto-activarse (Ouyang *et al.*, 2000). De modo similar, Foxp3 puede mantener su propia expresión en células Treg (Zheng *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha observado auto-activación de ROR γ t, pero este

factor de transcripción induce la expresión de la citocina amplificadora IL-21, la cual actúa de modo autocrino manteniendo la expresión de ROR γ t (Nurieva *et al.*, 2007; Korn *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007).

1.7.2. Regulación cruzada entre subpoblaciones de linfocitos Th

Una característica crucial de la diferenciación de las subpoblaciones Th es la existencia de regulación inhibitoria entre unos subtipos y otros. Las citocinas producidas por los linfocitos, además de promover la amplificación de la diferenciación propia, se caracterizan por su capacidad de causar inhibición de la diferenciación de otros linajes Th. De manera que la célula Th primordialmente activada durante una respuesta inmune inhibe el desarrollo del resto de subpoblaciones Th, favoreciéndose así aún más la dominancia de una subpoblación determinada en dicha respuesta.

La regulación cruzada entre las distintas subpoblaciones puede tener lugar través de diferentes mecanismos. La base de la regulación se produce mediante la inhibición causada por la acción de las citocinas. Éstas activan factores de transcripción que dan lugar a diferentes mecanismos de regulación cruzada entre subpoblaciones, tales como: la unión directa con el factor de transcripción involucrado en la diferenciación de otra subpoblación; los mecanismos de competencia entre factores de transcripción por el sitio de unión de un gen característico de una subpoblación; o la regulación transcripcional de factores de transcripción o citocinas críticos para el desarrollo de otra subpoblación.

Se conocen numerosos ejemplos acerca de los diferentes mecanismos de regulación cruzada que establecen entre unas subpoblaciones y otras. Así, por ejemplo, los linfocitos Th1 inhiben el desarrollo de otras subpoblaciones linfoides T CD4 mediante múltiples mecanismos que conciernen tanto a su principal citocina secretada como a los factores de transcripción que expresan. La diferenciación hacia Th2 y Th17 es inhibida por la acción del INF γ secretado por células Th1. Así mismo, la diferenciación de ambas subpoblaciones se inhibe a través de T-bet, el cual, en colaboración con otros factores de transcripción, actúa inhibiendo a través de varios mecanismos que incluyen la interacción directa con otros factores de transcripción, los mecanismos de regulación transcripcional sobre otros factores de transcripción y los mecanismos de regulación transcripcional sobre citocinas y receptores de citocinas propios de otras subpoblaciones (Oestreich y Weinmann, 2012a).

A su vez, los linfocitos Th2 inhiben el desarrollo de otros linfocitos Th mediante mecanismos que también incluyen la acción de sus citocinas secretadas y su factor de transcripción característico. Así por ejemplo, la IL-25 suprime la respuesta de tipo Th17 (Kleinscheck *et al.*, 2007). Por otro lado, a través del *master regulator* GATA3 las células Th2 inhiben la diferenciación de los linfocitos Th1, mediante diversos mecanismos, como la inhibición de la expresión de IFN γ , STAT4, etc (Ouyang *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Kanhere *et al.*, 2012).

Al igual que otros linfocitos Th, los linfocitos Treg, además de su función inhibidora de la actividad linfoide, pueden inhibir los procesos de diferenciación hacia otras subpoblaciones mediante mecanismos de regulación cruzada. Por ejemplo, el factor de transcripción Foxp3 interacciona con

ROR γ t bloqueando su función (Zhou *et al.*, 2008). Otro ejemplo destacado lo constituye el mecanismo de competencia entre las células Treg y Th17 basado en la competición entre STAT5 y STAT3, que presentan acciones antagónicas, por los sitios de unión al *locus* del gen que codifica para IL-17 (Yang *et al.*, 2011). Además de este mecanismo de regulación cruzada, los linfocitos Th17 presentan también la capacidad de inhibición del desarrollo de otros linfocitos T CD4. Por ejemplo, la citocina IL-21 inhibe la diferenciación hacia Th1, ya que la exposición de células naïve a dicha citocina conduce a la disminución de la producción de IFN γ (Suto *et al.*, 2006).

1.7.3. Mecanismos de finalización

Los estudios acerca de los mecanismos de regulación de la diferenciación linfoide presentan numerosas evidencias acerca de los mecanismos de amplificación y regulación cruzada. Sin embargo, hasta la fecha, se conoce poco acerca de los mecanismos de finalización. Se sabe que existen mecanismos de retroalimentación negativos, pero están poco estudiados. Un ejemplo de retroalimentación negativa lo constituye la secreción de IL-10. Cada linaje puede producir esta citocina bajo ciertas circunstancias, lo cual podría tener una función limitante de la actividad efectora propia. De esta manera se desarrollaría un mecanismo de autocontrol que provocaría el fin de la respuesta Th y evitaría la aparición de inmunopatología. Este mecanismo de finalización ha sido propuesto por varios autores para la subpoblación Th1 (Trinchieri, 2007; O'Garra y Vieira, 2007; Cope *et al.*, 2011) y también para el subtipo Th17 (McGeachy *et al.*, 2007). Otro mecanismo de finalización consiste en la supresión mediada por linfocitos Treg reclutados por los propios linfocitos T efectores hacia el lugar de la infección. Así, la IL-17 producida por las células Th17 durante la infección en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) induce la expresión del ligando de CCR6 (CCL20), promoviendo el reclutamiento hacia los sitios de inflamación de linfocitos que expresan CCR6, entre los que se encuentran las células Treg (Yamazaki *et al.*, 2008). De tal modo que, el reclutamiento de células Treg mediado por la citocinas IL-17 establecería un mecanismo de auto-regulación negativa que limitaría las respuestas inflamatorias mediadas por las células Th17 y Th1.

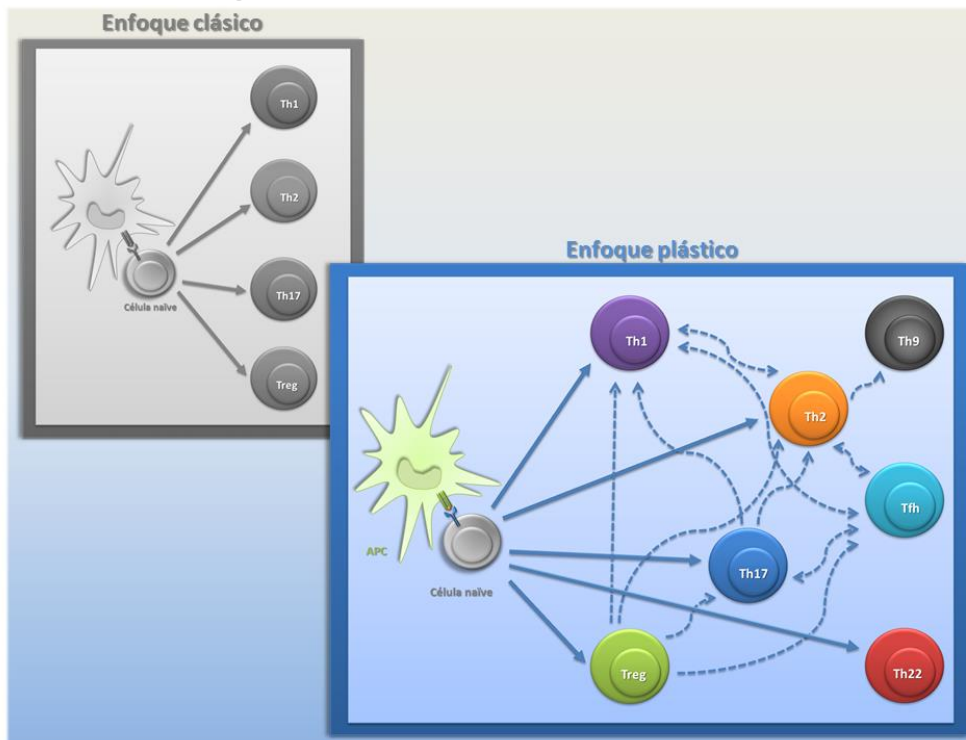
2. PLASTICIDAD LINFOIDE

La investigación acerca de la clasificación de los linfocitos Th inicialmente ofreció un punto de vista estático, en el que cada subpoblación era diferenciada en la presencia de un *master regulator* y adquiriría un fenotipo concreto de forma irreversible. Sin embargo, las investigaciones de los últimos años han mostrado que estas células son mucho más flexibles de lo que inicialmente se consideraba. Un gran número de análisis revelan que los linfocitos diferenciados retienen la capacidad para re-diferenciarse, de tal manera que, con la apropiada estimulación, pueden reprogramarse hacia otros linajes. Se han observado múltiples relaciones de plasticidad entre las diferentes subpoblaciones linfoides (véase Figura 7).

Relacionada con esta cualidad plástica de los linfocitos se ha observado la existencia de heterogeneidad dentro de cada subpoblación de células Th. Esta heterogeneidad queda reflejada de

forma patente en la flexibilidad de las citocinas producidas por un mismo tipo celular. Diferentes autores han mostrado heterogeneidad en las distintas subpoblaciones, tales como Th2 (Prussin *et al.*, 2010) y Th17 (Ghoreschi *et al.*, 2011), entre otras.

Figura 7. Plasticidad de las células T colaboradoras.



Nota: Representación esquemática del enfoque clásico de la diferenciación linfocitaria, en el que cada subpoblación es terminalmente diferenciada, y del enfoque nuevo, en el que se tiene en cuenta la plasticidad linfocitaria entre las distintas subpoblaciones.

2.1. CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LA PLASTICIDAD LINFOIDE

Los estudios acerca de la plasticidad de los linfocitos T CD4 son muy recientes y, por tanto, no existe una información concreta que indique claramente las características que determinan dicha plasticidad. No obstante, pueden destacarse dos principales propiedades de las células Th que indican la existencia de plasticidad linfocitaria: la flexibilidad en la producción de citocinas y la flexibilidad de expresión de factores de transcripción.

Una de las evidencias que empezaron a apuntar la existencia de la plasticidad linfocitaria fue el descubrimiento de la existencia de **flexibilidad en la producción de citocinas** por parte de las subpoblaciones Th diferenciadas. Se observó que una misma citocina podía ser secretada por diferentes subtipos de células Th. Por ejemplo, la IL-10 puede ser producida por linfocitos Th1, Th2, Th17, Treg y Tfh. Por otro lado, los avances en esta área han mostrado que la expresión de citocinas en una subpoblación determinada no es estática, sino que se ve modificada por el microambiente presente en cada momento. Así, por ejemplo, las células Th2 en presencia de TGF β adquieren la capacidad de producir IL-9 (Veldhoen *et al.*, 2008a). Esta inestabilidad conduce a la aparición de co-

expresión de citocinas típicas de los distintos subtipos de linfocitos Th, apareciendo así poblaciones intermedias entre dos subtipos con características de ambos. Un ejemplo destacado que ilustra este hecho es la existencia de poblaciones intermedias entre los fenotipos Th17 y Th1 que expresan tanto IL-17 como IFN γ (véase *Bloque III. Apartado 3.2.1.*).

Por otra parte, al igual que en el caso de la producción de citocinas, las investigaciones de los últimos años han indicado la existencia de **flexibilidad de expresión de los factores de transcripción** característicos de linaje. Muchos estudios han descrito la co-expresión transitoria de diferentes *master regulators* en una misma célula Th durante las fases tempranas de la diferenciación. Dicha co-expresión en estos estadios permite que se promueva la expresión en favor de un factor de transcripción u otro en función de las señales del microambiente que recibe la célula. Sin embargo, estudios recientes indican también la existencia de una co-expresión estable de factores de transcripción definitorios de linaje en subpoblaciones Th diferenciadas (Oestreich y Weinmann, 2012b). Actualmente, se conoce que esta co-expresión es necesaria ya que el *master regulator* por sí solo no es suficiente para definir el fenotipo de la subpoblación Th (Oestreich y Weinmann, 2012b). Mencionado fenotipo viene determinado por los programas de expresión génica activados en las células, los cuales se ven afectados por esta co-expresión. La interacción entre los distintos factores de transcripción determina el fenotipo celular final. De tal modo que, en función de los gradientes de expresión de *master regulators* expresados, la dominancia en cada momento de un factor sobre los otros conduce al cambio de fenotipo celular. Se ha descrito la existencia de múltiples combinaciones de co-expresión entre factores de transcripción, tales como GATA3 y T-bet, de ROR γ t y T-bet, Bcl-6 y T-bet, entre otras (Oestreich y Weinmann, 2012b). Aunque se apunta a que la co-expresión confiere plasticidad y flexibilidad en la respuesta Th, la funcionalidad exacta de dicha co-expresión está aún por determinar en la mayoría de los casos. No obstante, algunas investigaciones sugieren funciones concretas relacionadas con esta co-expresión de *master regulators*. En el caso de las células Treg, los datos recientes muestran que la co-expresión de Foxp3 con factores de transcripción asociados a las diferentes subpoblaciones Th efectoras, confiere a las células Treg la propiedad de controlar las distintas respuestas inmunes Th. De tal manera que, los linfocitos Treg que co-expresan Foxp3 y T-bet se encargan de regular la respuesta inmune mediada por células Th1 (Koch *et al.*, 2009), las células reguladoras co-expresoras de Foxp3 y IRF4 modulan la respuesta inmune de tipo Th2 (Zheng *et al.*, 2009), y los linfocitos Treg que co-expresan Foxp3 y STAT3 modulan la respuesta inmune de las células Th17 (Chaudhry *et al.*, 2009). Así, la co-expresión de factores de transcripción otorga a las células Treg una gran flexibilidad y, ante todo, especialización de respuesta.

2.2. MECANISMOS INDUCTORES DE PLASTICIDAD LINFOIDE

En la actualidad, la habilidad de los linfocitos T CD4 para cambiar de fenotipo parece clara. Sin embargo, los factores o mecanismos que conducen a dicha plasticidad no están perfectamente definidos. Se han propuesto diferentes mecanismos, conocidos por su implicación en los procesos de

diferenciación linfoide, como posibles inductores de plasticidad. Dichos mecanismos pueden agruparse en dos grupos, mecanismos celulares extrínsecos e intrínsecos.

Los **mecanismos celulares extrínsecos** comprenden por un lado a las citocinas y, por otro, al SI innato. Las **citocinas** presentes en el microambiente celular se han definido como importantes agentes inductores de plasticidad sobre los linfocitos T CD4, ya que pueden activar, inhibir y modificar directamente células Th diferenciadas. Existen numerosos ejemplos que muestran como determinado fenotipo Th puede sufrir plasticidad hacia otro fenotipo en presencia de citocinas concretas. Así, por ejemplo, la presencia de interferones de tipo 1 induce la conversión de células Th2 a Th1, ya que induce la expresión de IL-12R en células Th2, lo que permite la activación de la cascada de señalización de la IL-12 y por consiguiente la inducción de la expresión de T-bet y la secreción de IFN γ (Hegazy *et al.*, 2010). Por otra parte, las células T CD4 establecen interacciones con células y receptores del **SI innato**, los cuales han sido propuestos como posibles mecanismos potenciadores de la plasticidad entre subpoblaciones diferentes, ya que influyen en los procesos de diferenciación linfoide (Coomes *et al.*, 2013). De manera que, la afinidad o la dosis del péptido presentado por las células presentadoras de antígeno; la presencia de determinadas moléculas co-estimuladoras, como los miembros de la familia B7; la interacción con receptores de tipo TLR específicos; y la presencia de unas u otras células del SI innato; podrían influenciar en la plasticidad de las células Th.

Los **mecanismos celulares intrínsecos** inductores de plasticidad linfoide abarcan numerosos elementos, tales como los factores de transcripción, las modificaciones epigenéticas, la regulación post-transcripcional mediada por miRNAs, el estado de maduración celular y la disponibilidad de nutrientes y vías metabólicas.

Además de constituir una característica definitoria de plasticidad, los **factores de transcripción** establecen uno de los mecanismos inductores de plasticidad. Como se menciona con anterioridad, la presencia o ausencia de un determinado factor de transcripción, así como la dominancia de expresión de unos factores sobre otros, se encuentran fuertemente asociadas a los procesos de plasticidad linfoide. Los factores de transcripción mantienen activados y reprimidos los distintos programas génicos de las células Th. Para ello se requiere de una continua activación, fosforilación y presencia de dichos factores en el núcleo celular. La aparición de determinadas señales inductoras o activadoras de un factor de transcripción concreto conduce a la dominancia de un factor sobre los otros, lo que conlleva a su vez la reprogramación del fenotipo celular. Por otro lado, la regulación cruzada que se establece entre distintos factores de transcripción puede constituir un mecanismo de regulación muy importante en los procesos de plasticidad linfoide. Numerosos ejemplos relacionados con la expresión de los factores de transcripción y plasticidad han sido propuestos en la literatura. Tal es el caso de las células Th1 en las que T-bet forma un complejo con Bcl-6, previniendo la función de este último. Sin embargo, en condiciones limitantes de IL-2, la expresión de Bcl-6 en estas células aumenta y son capaces de expresar genes asociados a linfocitos Tfh (Oestreich *et al.*, 2012c).

Por su parte, las **modificaciones epigenéticas** que tienen lugar en los diferentes subconjuntos de linfocitos T CD4 se han asociado más a estabilidad fenotípica que a plasticidad, ya que muchas modificaciones confieren estabilidad en la expresión génica. Sin embargo, se sabe que la regulación epigenética es un proceso muy dinámico (Hirahara *et al.*, 2011). Además, la investigación desarrollada en el área de la epigenética y la plasticidad linfoide destaca la importancia de la existencia de marcadores bivalentes en los linfocitos Th. Los estudios muestran que las células T CD4 presentan simultáneamente marcadores bivalentes que permiten el incremento o la represión de la expresión génica de genes que codifican para los factores de transcripción, lo que indica una posible reversibilidad en cuanto a los niveles de expresión de dichos factores. Por ejemplo, las células Treg presentan marcadores bivalentes en los genes *Tbx21*, *Gata3* y *Rorc*, lo que permite que estas células puedan expresar factores de transcripción característicos de otras subpoblaciones. Así mismo, la **regulación post-transcripcional**, se ha propuesto como un posible mecanismo inductor de plasticidad linfoide. La regulación mediada por **miRNAs** es la más ampliamente estudiada. Los miRNAs son críticos en la regulación de la expresión de moléculas clave para el proceso de diferenciación de linfocitos T CD4 y se ha mostrado una expresión distinta de los miRNAs en cada subpoblación Th. Sumada a esta expresión diferencial, la existencia de miRNAs supone otro posible mecanismo de regulación relacionado con la plasticidad linfoide (Pagani *et al.*, 2013). De modo similar a los miRNAs, también se ha propuesto que distintos lncRNAs se asocian a los distintos subtipos de células Th (Pagani *et al.*, 2013). De modo que, la regulación post-transcripcional mediante miRNAs y lncRNAs, posiblemente representa un sistema plástico y ajustable que modula la plasticidad entre los distintos subtipos de células Th (Baumjohann y Ansel, 2013; Pagani *et al.*, 2013).

Por otro lado, el **grado de maduración celular** de los linfocitos también ha sido relacionado con los procesos de plasticidad linfoide. Los primeros estudios mostraron que, en este caso, se trataba de una correlación inversa. De manera que la plasticidad se asociaba a células recientemente diferenciadas, mientras que las células maduras parecían ser más estables y por tanto, menos plásticas. Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto que también las células T CD4 memoria presentan plasticidad (Ahmadzadeh y Farber, 2002; Krawczyk *et al.*, 2007; Lees y Farber, 2010). Dicha plasticidad se produce en función de las condiciones microambientales en el momento de la segunda estimulación antigénica. De esta manera, la plasticidad funcional de las células memoria permitiría un ajuste continuo de la respuesta inmune.

Finalmente, las investigaciones recientes acerca de los posibles agentes inductores de plasticidad linfoide apuntan que la **disponibilidad de nutrientes** y las **vías metabólicas** activadas en las células Th constituyen un factor potenciador de plasticidad. Tras la activación celular, las células Th efectoras rápidamente aumentan su consumo de glucosa y por tanto la glicolisis (Jacobs *et al.*, 2008; Maciver *et al.*, 2008), mientras que las células Treg activan el metabolismo lipídico oxidativo y en menor medida la glicolisis (Michalek *et al.*, 2011). La activación de las vías metabólicas es necesaria en la célula Th, ya que su inhibición impide la activación, proliferación, secreción de citocinas, así como las funciones celulares (Dziurla *et al.*, 2010). Se han asociado determinadas enzimas de las vías

metabólicas a la diferenciación de subpoblaciones concretas. De modo que las vías metabólicas regulan selectivamente la producción de citocinas. Por tanto, la disponibilidad de nutrientes así como las vías metabólicas activadas pueden suponer otro factor regulador del cambio de fenotipo en las células T CD4.

A pesar de los numerosos estudios que se están realizando en esta área, aún no se conocen con exactitud los mecanismos inductores de plasticidad ni sus implicaciones fisiológicas. Varios investigadores apuntan a que dicha plasticidad podría suponer una ventaja evolutiva al aportar una gran amplitud en la capacidad de respuesta inmune de las células Th (O'Shea y Paul, 2010; Wan, 2010; Oestreich y Weinmann, 2012b; Coomes *et al.*, 2013). La plasticidad linfoide habilitaría a las células Th para responder frente a condiciones ambientales cambiantes, afinándose así la respuesta inmune en tiempo real y proveyendo una capacidad de respuesta frente a múltiples agentes. Sin embargo, también ha sido apuntado que dicha plasticidad podría tener efectos no beneficiosos relacionados con varios modelos de infección (Coomes *et al.* 2013). Si bien, no cabe duda de que el conocimiento de la existencia de la plasticidad linfoide provee importantes consideraciones a tener en cuenta en relación a la patogénesis de múltiples enfermedades inmunes, así como en sus terapias.

BLOQUE III: LINFOCITOS Th17

El descubrimiento de las células Th17 supuso un cambio de concepto en relación al paradigma Th1/Th2, a partir del cual se desencadenó la posibilidad de la existencia de otros subtipos. Hasta que tuvo lugar tal descubrimiento, muchas enfermedades autoinmunes eran consideradas como enfermedades caracterizadas por una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, los inmunólogos encontraron un dilema realizando experimentos en dos modelos experimentales de enfermedades de este tipo, la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) y la artritis inducida por colágeno (CIA, del inglés *Collagen induced arthritis*). Se observó que, contrario a lo esperado, la enfermedad era agravada en la ausencia de citocinas, receptores o factores de transcripción asociados a células Th1, tales como el IFN γ , el receptor de IFN γ , la subunidad IL-12p35 o el receptor IL-12R β 2 (Manoury-Schwartz *et al.*, 1997; Verriere *et al.*, 1997; Tran *et al.*, 2000; Gran *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Hasta el momento se había descrito que la deficiencia la subunidad IL-12p40 mostraba una menor severidad e incidencia frente a estas enfermedades (McIntyre *et al.*, 1996; Heremans *et al.*, 1999), asignando así el papel patogénico a la IL-12. Sin embargo, en ese tiempo fue descrita la existencia de una nueva citocina, la IL-23, la cual compartía la subunidad IL-12p40, caracterizada hasta entonces como propia de la IL-12 únicamente (Oppmann *et al.*, 2000). Analizando la función de esta nueva citocina, se observó que los ratones deficientes para la subunidad IL-23p19, específica de la IL-23, eran protegidos frente a EAE o CIA (Cua *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003). En paralelo, en aquel momento se describió que la presencia de IL-23 era necesaria para la expansión de una subpoblación caracterizada por la expresión de IL-17 (Aggarwal *et al.*, 2003). Finalmente, en 2005 se produjo la caracterización de una nueva subpoblación de linfocitos Th que producía esta citocina, la subpoblación Th17 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Esta subpoblación era expandida en respuesta a IL-23 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Aggarwal *et al.*, 2003) y era capaz de inducir EAE (Langrish *et al.*, 2005). Nació así la existencia de un nuevo subconjunto celular Th, con características fenotípicas y un proceso de diferenciación propios, que transformó los conceptos establecidos hasta el momento en el área de la inflamación y la autoinmunidad.

1. FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS Th17

Las funciones fisiológicas de los linfocitos Th1 y Th2 en la defensa del huésped frente a diferentes tipos de patógenos eran bien conocidas en el momento en que se descubrió la nueva subpoblación Th17. La adición de la subpoblación Th17 completó aún más la estrategia del huésped en la defensa frente a diversas infecciones, las cuales no eran eficientemente resueltas por las subclases Th conocidas. Este linaje constituye una respuesta de la inmunidad adaptativa que actúa frente a las infecciones causadas por patógenos que requieren de una respuesta inflamatoria masiva. Las células Th17 contribuyen a la protección frente a varios patógenos, fundamentalmente bacterias extracelulares y hongos (Aujla *et al.*, 2007; Ouyang *et al.*, 2008; Curtis y Way, 2009; Khader *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; van de Veerdonk *et al.*, 2009; Blaschitz y Raffatellu, 2010; Peck y Mellins, 2010a; Graeber y Olsen, 2012; Huber *et al.*, 2012; McGeachy y McSorley, 2012; Tsai *et al.*, 2013). En condiciones fisiológicas, las células

Th17 se localizan de forma natural en las mucosas, fundamentalmente en la lámina propia del intestino delgado, pero también en las vías respiratorias y la piel. En tales mucosas existe una continua exposición a numerosos patógenos, por lo que es necesaria una defensa que constituya protección frente a un gran número de agentes infecciosos. En este sentido, la función anti-bacteriana y anti-fúngica de las células Th17 es muy amplia, ya que estas células están involucradas en la defensa contra numerosos patógenos que colonizan estas mucosas. Se ha mostrado que estos linfocitos desempeñan una importante función en la inmunidad frente a bacterias gramnegativas como *Klebsiella pneumoniae* (Ye *et al.*, 2001a; Happel *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011a), *Bordetella pertusis* (Higgins *et al.*, 2006), *Citrobacter rodentium* (Mangan *et al.*, 2006; Ishigame *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2009), *Salmonella typhimurium* (Raffatellu *et al.*, 2008) o *Porphyromonas gingivalis* (Yu *et al.*, 2007a). Además de la defensa frente a bacterias de tipo gramnegativo, las células Th17 también participan en la protección frente a otros tipos de bacterias, como bacterias grampositivas, bacterias intracelulares u otros tipos. Entre ellas destacan especies como *Staphylococcus aureus* (Ishigame *et al.*, 2009), *Streptococcus pneumoniae* (Lu *et al.*, 2008a; Zhang *et al.*, 2009), *Mycobacterium tuberculosis* (Khader *et al.*, 2007), *Francisella tularensis* (Lin *et al.*, 2009) o *Mycoplasma pneumonia* (Wu *et al.*, 2007). Por otro lado, los linfocitos Th17 son también activos en la defensa anti-fúngica. Principalmente se ha descrito su función en la protección contra infecciones causadas por *Candida albicans* (Hernández-Santos y Gaffen, 2012; McGeachy y McSorley, 2012). Sin embargo, también se ha mostrado un efecto protector frente a las infecciones causadas por otros hongos como *Aspergillus fumigatus* (Werner *et al.*, 2009), *Pneumocystis carinii* (Rudner *et al.*, 2007) o *Cryptococcus neoformans* (Kleinscheck *et al.*, 2006). Finalmente, aunque la defensa anti-viral y anti-parasitaria se ha asignado a la función de otras subpoblaciones Th, diversas evidencias sugieren la posibilidad de una implicación de los linfocitos Th17 en la protección frente a otros patógenos, diferentes a los descritos, como virus o parásitos (van de Veerdonk *et al.*, 2009).

Para subrayar aún más la importante función fisiológica del recién descubierto subconjunto Th17, la identificación de varias inmunodeficiencias genéticas humanas caracterizadas por la pérdida de la función Th17 ha mostrado la destacada función llevada a cabo por estas células en la defensa del huésped. De este modo, la importancia de la función protectora de estas células en humanos queda claramente demostrada en individuos que padecen candidiasis mucocutánea crónica (CMC). Estos pacientes sufren infecciones recurrentes causadas por *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Kirkpatrick, 2001). Numerosas deficiencias genéticas que implican una disfunción de las células Th17 se han asociado con el padecimiento de CMC. En este sentido, se ha descrito la función protectora de las células Th17 en la protección frente a la candidiasis gracias al estudio de pacientes con síndrome de Hiper-IgE, síndrome poliendocrino autoinmune tipo I, deficiencia autosómica recesiva para IL-17RA y deficiencia autosómica dominante para IL-17F, entre otras (Puel *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2012). Los pacientes con síndrome de Job o síndrome Hiper-IgE sufren infecciones recurrentes que afectan a varios tejidos (Grimbacher *et al.*, 1999). Estos pacientes presentan diversas mutaciones en STAT3 que inactivan la molécula, mostrando una incapacidad o deficiencia en la generación de células Th17, la cual es directamente responsable de la susceptibilidad incrementada a las infecciones que presentan

estos pacientes. (Holland *et al.*, 2007; de Beaucoudrey *et al.*, 2008; Freeman y Holland, 2008; Ma *et al.*, 2008; Milner *et al.*, 2008; Al Khatib *et al.*, 2009; Minegishi *et al.*, 2009). Por otra parte, los individuos que padecen el síndrome poliendocrino autoinmune tipo I presentan anticuerpos circulantes neutralizantes frente a IL-17, IL-17F e IL-22 mostrando una función deficiente de tipo Th17 (Kisand *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2010). De forma similar, las inmunodeficiencias genéticas para el receptor de IL-17, IL-17 o para la citocina IL-17F muestran también la importante función de estos linfocitos en la defensa del huésped (Puel *et al.*, 2011). Finalmente, otras inmunodeficiencias no congénitas muestran también la acción protectora de los linfocitos Th17 frente a las infecciones. Es el caso de los individuos que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estos pacientes sufren infecciones oportunistas causadas por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pneumoniae*, entre otros patógenos (Hirschtick *et al.*, 1995; Crum-Cianflone *et al.*, 2009). En la infección causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), dentro del conjunto linfoide gastrointestinal, principalmente se ven afectadas las células Th17, lo que compromete la integridad intestinal y facilita el desarrollo de la infección (Brenchley *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo su función en la defensa del huésped, los linfocitos Th17 secretan varias citocinas. Las interleucinas secretadas de forma mayoritaria son IL-17, IL-21 e IL-22. Sin embargo, estas células producen también otras moléculas como IL-26, GM-CSF y CCL20, entre otras.

Estas citocinas producidas por las células Th17 permiten su comunicación con una amplia variedad de células inmunes y no inmunes. Así mismo, los mecanismos de acción de estas citocinas son muy diversos. En su conjunto constituyen la inducción de una respuesta inmune extensa y eficaz, que abarca tanto la inmunidad innata como la adaptativa. De manera resumida, a través de la secreción de citocinas, las células Th17 promueven el reclutamiento de células inmunes al lugar de la infección; la producción de péptidos antimicrobianos; la activación, supervivencia y proliferación de diversos tipos celulares; o la inducción de la respuesta humoral, entre otras funciones.

1.1. CITOCINA IL-17

En 1993 se describió y clonó por primera vez el gen que codifica para la IL-17 murina, denominada entonces CTLA-8 (Rouvier *et al.*, 1993). Posteriormente, esta nueva citocina fue renombrada como IL-17 (Yao *et al.*, 1995a) e identificada también en humanos (Yao *et al.*, 1995b).

La IL-17 es el miembro prototipo de la **familia de citocinas IL-17** (Aggarwal y Gurney, 2002) (véase *Tabla 1*). Esta familia incluye seis miembros: IL-17 (IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F (Moseley *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2004; Weaver *et al.*, 2007; Gaffen, 2009; Pappu *et al.*, 2010; Iwakura *et al.*, 2011). De todas ellas, los linfocitos Th17 son capaces de secretar las citocinas IL-17 e IL-17F.

Tabla 1. Familia de citocinas y receptores de la IL-17.

A. Familia de citocinas de la IL-17

Citocina	% Homología cIL-	Receptor	Cromosoma
IL-17A	100	IL-17RA, IL-17RC	6p12
IL-17B	24	IL-17RB	5q32-34
IL-17C	26	IL-17RA, IL-17RE	16g24
IL-17D	30	-	13q12.11
IL-17E	16	IL-17RA, IL-17RB	14q11.2
IL-17F	50	IL-17RA, IL-17RC	6p12

B. Familia de receptores de la IL-17

Receptor	Citocina	Cromosoma
IL-17RA	IL-17A, IL-17F	22q11.1
IL-17RB	IL-17B, IL-17E	3p21.1
IL-17RC	IL-17A, IL-17F	3p25.3
IL-17RD	-	3p21.2
IL-17RE	IL-17C	3p25.3

Nota: La tabla muestra las características de la familia de citocinas (A) y receptores (B) de la IL-17 humana. Modificado de Kramer y Gaffen, 2007.

Entre todos los miembros, la IL-17F es la citocina que presenta mayor grado de homología con respecto a la IL-17 (aproximadamente 50%) (Hymowitz *et al.*, 2001). Los genes que codifican para estas dos citocinas se encuentran agrupados, en el cromosoma 1 en ratón y en el cromosoma 6 en humano (Hymowitz *et al.*, 2001). Sin embargo, el resto de los miembros de la familia se localiza en otros cromosomas. La similitud entre ambas citocinas abarca, no sólo a su estructura y localización génica, sino también a su distribución y función. Ambas citocinas se producen en fuentes celulares similares, siendo generalmente co-expresadas por una misma célula (Chang y Dong, 2009). Además sus funciones son muy similares, ya que señalizan a través del mismo receptor (Toy *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008). Por su parte, el resto de miembros de la familia presentan menor grado de homología con la citocina IL-17. La IL-25 es la citocina de la familia más divergente, ya que su grado de homología con la IL-17 es aproximadamente un 16% (Iwakura *et al.*, 2011).

En relación a su **estructura**, la IL-17 murina es una glicoproteína compuesta por 147 aminoácidos, que se secreta en forma dimérica con un peso molecular aproximado de 21kDa (Kilo Dalton). En humanos presenta 155 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 35kDa. Ambas citocinas presentan una homología aproximada del 63%. Como se menciona con anterioridad, su forma funcionalmente activa consta de un dímero, que puede ser un homodímero o un heterodímero, formado con la citocina IL-17F (Liang *et al.*, 2007).

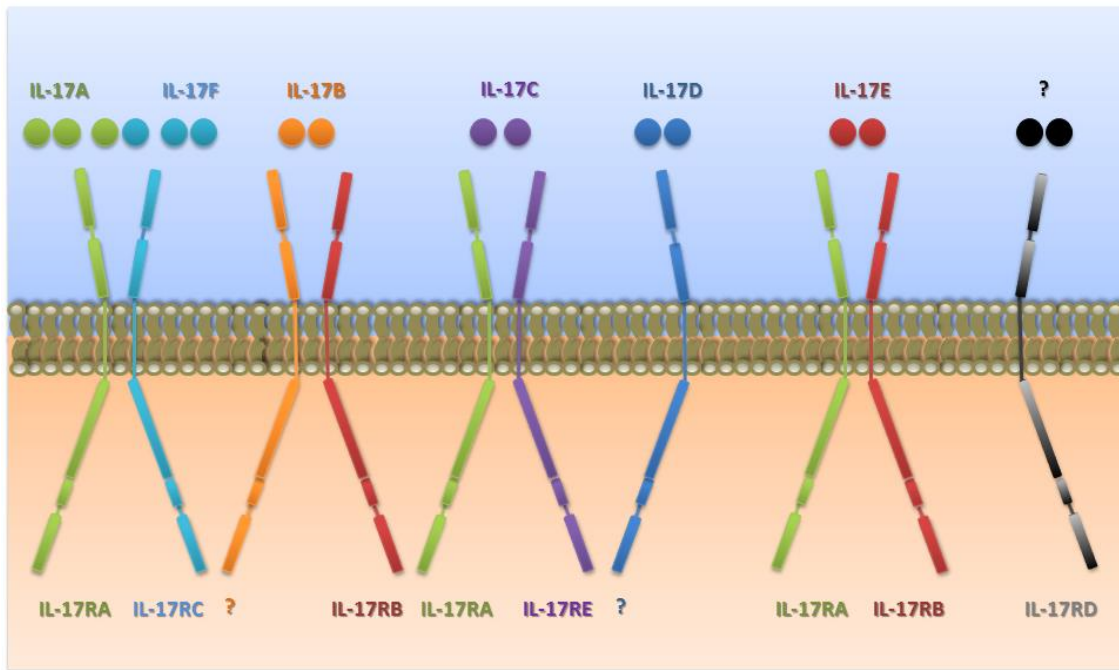
Esta glicoproteína, es capaz de producirse por una gran variedad de **fuentes celulares**. Además de ser secretada por las células Th17, es producida por varios tipos celulares, incluyendo células $\gamma\delta$, T CD8, células iNKT, células NK, células inductoras de tejido linfoide (LTi, del inglés *Lymphoid Tissue*

inducer) y neutrófilos, entre otros tipos celulares (Cua y Tato, 2010; Reynolds *et al.*, 2010; Kim y Jordan, 2013). Recientemente se ha descrito también su producción por parte de células B (Schlegel *et al.*, 2013). Por otro lado, algunos trabajos han mostrado que la IL-17 puede secretarse también en células no inmunes, como las células epiteliales intestinales denominadas células de Paneth (Takahashi *et al.*, 2008) o células epiteliales de colon (Ishigame *et al.*, 2009).

Las funciones que desempeña esta citocina son mediadas gracias a la unión a su receptor, **IL-17R**. Este receptor pertenece a una familia de receptores compuesta por cinco miembros: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE (Moseley *et al.*, 2003; Gaffen, 2009; Pappu *et al.*, 2010) (véase *Tabla 1*). Cabe destacar que de todos estos receptores, se ha descrito que las células Th17 expresan el receptor IL-17RE (Chang *et al.*, 2011). Los receptores para IL-17 e IL-17F son IL-17RA e IL-17RC (Hymowitz *et al.*, 2001; Toy *et al.*, 2006; Kuestner *et al.*, 2007; Ely *et al.*, 2009). El receptor IL-17RA muestra una expresión casi ubicua sobre un amplio rango de tejidos y tipos celulares. Se expresa fuertemente en células del SI, pero también, aunque en menores niveles, en osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales (Yao *et al.*, 1995a). En contraste con IL-17RA, IL-17RC se expresa a bajos niveles en células del SI, mientras su expresión en células no hematopoyéticas es alta. Su expresión es mayoritaria en órganos como glándula adrenal, próstata, riñón, tiroides, colon, intestino e hígado (Kuestner *et al.*, 2007; Ishigame *et al.*, 2009).

Los miembros de esta familia son receptores transmembrana de tipo I y se caracterizan porque presentan un dominio transmembrana y un dominio largo intracelular C terminal (Yao *et al.*, 1995a) (véase *Figura 8*). Excepto el receptor IL-17RA, los receptores de la familia IL-17 pueden presentar procesamiento alternativo, generándose así formas solubles de los mismos (Haudenschild *et al.*, 2002). Al igual que las citocinas, estos receptores son funcionales en forma dimérica. Pueden formar homo o heterodímeros con otras subunidades de la misma familia. Dependiendo del dímero formado presentan afinidad por una u otra citocina de la familia (Toy *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008; Iwakura *et al.*, 2011).

Figura 8. Familia de citocinas y receptores IL-17.

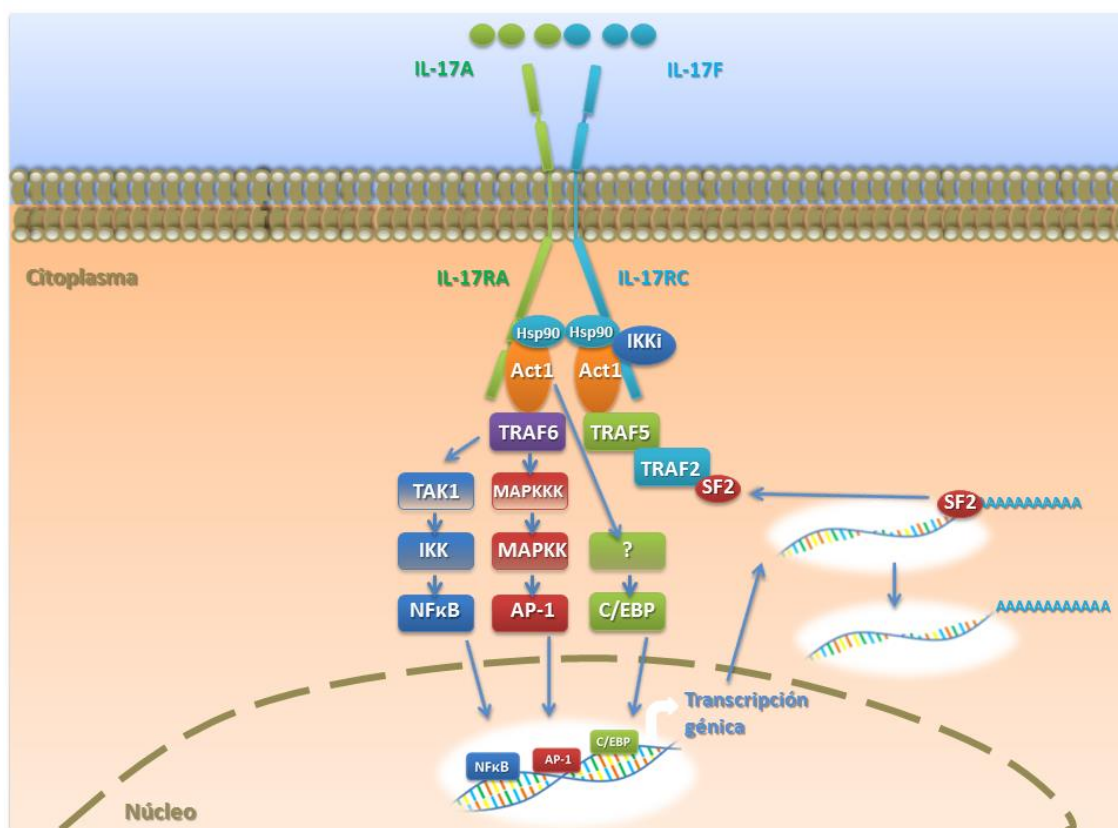


Nota: Representación esquemática de la dimerización de las citocinas y receptores de la familia de la IL-17.

La **señalización** al interior celular de la IL-17 tiene lugar, por tanto, a través de las dos subunidades del receptor, IL-17RA e IL-17RC (Toy *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008). Se ha propuesto que la unión del ligando a la primera subunidad del receptor (IL-17RA) altera la afinidad y especificidad de éste por IL-17RC, causando la unión de la segunda subunidad, dando lugar de esta manera a la formación del heterodímero (Ely *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013).

El mecanismo de señalización mediado por esta citocina es complejo y no se conoce enteramente con exactitud. De forma resumida, la IL-17 activa la vía de señalización que involucra principalmente la vía MAPKs, la vía NFκB y la vía C/EBPs (véase Figura 9). La activación de las diferentes vías de señalización se consigue gracias a la asociación del receptor a la proteína Act-1, la cual a su vez interacciona con diversos mediadores de señalización intracelular. Entre los diferentes mediadores se ha destacado la función de TRAF-6, sin embargo, Act-1 es capaz de actuar a través de IKKi, la chaperona Hsp90, TRAF5, TRAF2 y SF2, entre otras proteínas. (Gaffen, 2009; Gu *et al.*, 2013; Song y Qian, 2013).

Figura 9. Vía de señalización IL-17/IL-17R.



Nota: Representación esquemática de los principales mediadores en la señalización intracelular de las citocinas IL-17A e IL-17F a través de la unión a su receptor.

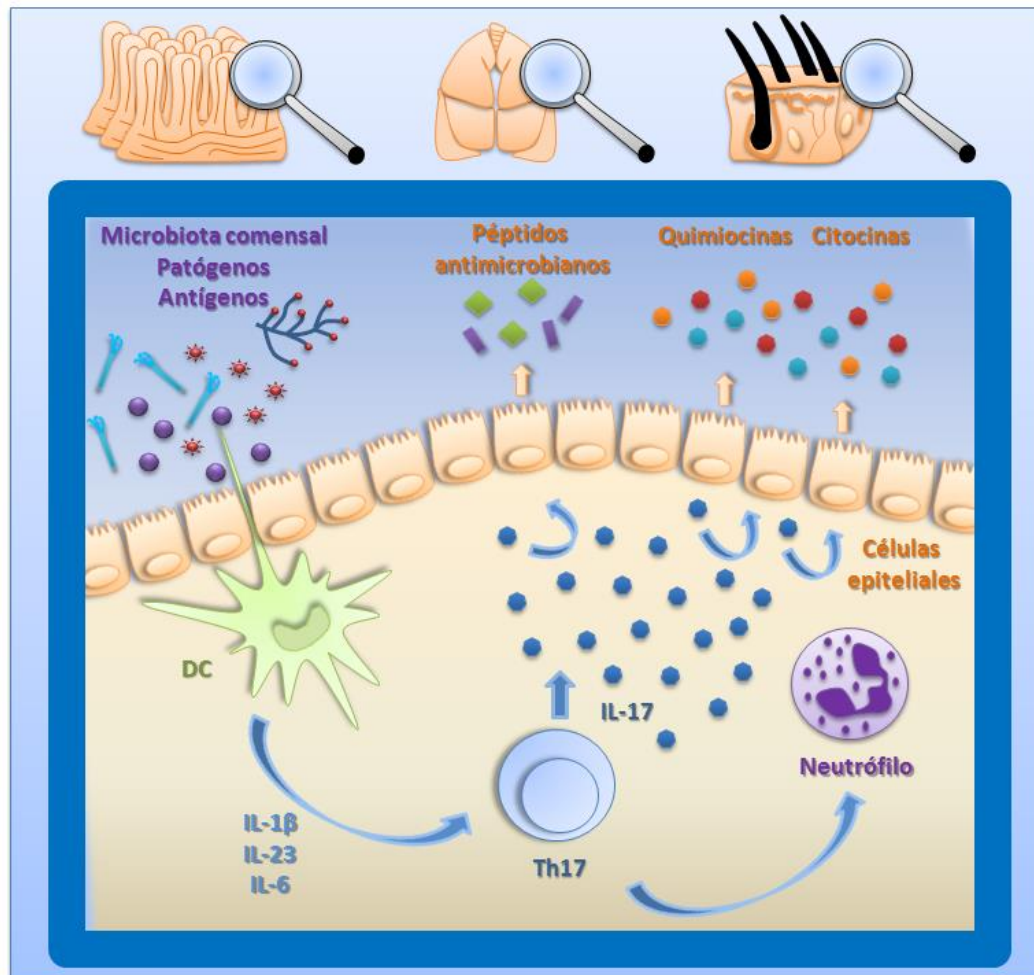
A través de la activación de estas vías de señalización intracelular, la IL-17 puede actuar en sinergia con otras citocinas. La actuación en sinergia con $\text{TNF}\alpha$ es un claro ejemplo de cómo la habilidad de esta citocina para funcionar en sinergia con otras aumenta su patogenicidad. Mientras la IL-17 activa levemente el factor $\text{NF}\kappa\text{B}$, $\text{TNF}\alpha$ induce su expresión fuertemente. Sin embargo, la expresión de mRNAs pro-inflamatorios, como el de la quimiocina CXCL1, causada por $\text{TNF}\alpha$ es altamente inestable, pero la IL-17 aumenta su expresión a través de la estabilización del mRNA (Hartupée *et al.*, 2007). De tal manera que, la actuación en sinergia de ambas citocinas promueve y prolonga la respuesta inflamatoria.

La IL-17 presenta una amplia **función**. Además de la ya mencionada inducción de la producción de quimiocinas inflamatorias, esta citocina ejerce numerosas funciones. La expresión casi ubicua de su receptor le permite ejercer un amplio rango de actividades sobre diversos tipos celulares. La IL-17 actúa sobre células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y monocitos/macrófagos. Constituye un nexo importante entre la inmunidad innata y adaptativa. En primer lugar, dado que es producida por células de ambos sistemas. Y, en segundo lugar, puesto que, producida por células del SI adaptativo (Th17), se encarga de activar la respuesta del SI innato, mediando así en la organización de una respuesta inmune efectiva.

Como se menciona con anterioridad, de forma natural los linfocitos Th17 se encuentran en las mucosas, donde ejercen su acción en la defensa frente a diversos patógenos (véase Figura 10).

Numerosos trabajos han puesto en evidencia la función clave de las células Th17, a través de la secreción de IL-17, en esta localización (Tsai *et al.*, 2013; Huber *et al.*, 2012; McGeachy y McSorley, 2012; van de Veerdonk *et al.*, 2009; Aujla *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Curtis y Way, 2009; Peck y Mellins, 2010a; Blaschitz y Raffatellu, 2010; Khader *et al.*, 2009).

Figura 10. Función de la IL-17 en la defensa de las mucosas.



Nota: Representación esquemática de la función de la IL-17 sobre la respuesta de los neutrófilos y la respuesta epitelial en la defensa de las mucosas.

Su función más destacada es la inducción de la respuesta desarrollada por los neutrófilos, sobre la cual se han publicado numerosos trabajos (Kim y Jordan, 2013; Aujla *et al.*, 2007; Ouyang *et al.*, 2008; Kolls y Lindén, 2004; Aggarwal y Gurney, 2002). Las células Th17, al secretar IL-17, proveen al huésped de mecanismo de defensa distinto al inducido por las células Th1 o Th2, al promover el reclutamiento de los neutrófilos al lugar de infección. Conjuntamente, el efecto de la IL-17 sobre los neutrófilos no sólo se ciñe al reclutamiento celular, sino que esta citocina media también los procesos de granulopoyesis que ejercen estas células. Por tanto, la IL-17 es un potente activador de la respuesta inmune innata mediada por los neutrófilos.

Por otro lado, la IL-17 además de promover el reclutamiento de células de la inmunidad innata como mecanismo de defensa, origina también una respuesta epitelial frente a la infección. Además de la secreción de moléculas pro-inflamatorias, esta citocina promueve sobre las células epiteliales la

secreción de péptidos antimicrobianos tales como defensinas β , lipocalina 2, mucinas o proteínas S100, los cuales funcionan como antibióticos naturales en las mucosas (Chen *et al.*, 2003b; Kao *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Conti *et al.*, 2009; Ishigame *et al.*, 2009; Rafatellu *et al.*, 2009).

Estas funciones ejercidas por la IL-17 se desarrollan gracias a su amplia capacidad pro-inflamatoria. Sus propiedades pro-inflamatorias abarcan la inducción de la expresión de numerosas moléculas que dan lugar a la inflamación (Moseley *et al.*, 2003; Kolls y Lindén, 2004; Aujla *et al.*, 2007; Xu y Cao, 2010; Zhu y Quian 2012). En primer lugar, la IL-17 promueve la expresión de varias citocinas, como TNF α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF (Yao *et al.*, 1995a; Fossiez *et al.*, 1996; Javanovic *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2001b; Jones y Chan, 2002). Así mismo, la IL-17 estimula la producción de quimiocinas de diversas clases, como quimiocinas de clase CXCL (CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL10) y quimiocinas de clase CC (CCL2, CCL7, CCL20), promoviendo el reclutamiento de diversos tipos celulares (Fossiez *et al.*, 1996; Laan *et al.*, 1999; Jones y Chan, 2002; Ruddy *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Khader *et al.*, 2007). Gracias a la inducción de la secreción de estos mediadores tiene lugar la organización de la respuesta inmune completa. De manera que, por ejemplo, mediante la promoción de la secreción G-CSF se induce la activación de los neutrófilos (Schwarzenberger *et al.*, 2000; Forlow *et al.*, 2001). No obstante, la IL-17 es capaz de estimular la secreción de otros mediadores pro-inflamatorios. Por un lado, induce la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés *Matrix Metallo-Proteinases*) tales como MMP3, MMP9 y MMP13 (Park *et al.*, 2005). Por otro lado, promueve la actividad de las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *inducible Nitric Oxide synthase*), dando lugar a la producción de los mediadores inflamatorios prostaglandina E2 (PGE2) y óxido nítrico (ON) (Fossiez *et al.*, 1996; Martel-Pelletier *et al.*, 1999). Finalmente, la IL-17 desarrolla otras funciones relacionadas con la respuesta inflamatoria frente a la infección tal como la participación en la formación de centros germinales (Hsu *et al.*, 2008; Mitsdoerffer *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2011a; Rangel-Moreno *et al.*, 2011).

De modo que, la IL-17 presenta múltiples e importantes mecanismos de acción que promueven la respuesta inflamatoria que da lugar a la resolución de la infección.

1.2. CITOCINA IL-21

La IL-21 fue descubierta en el año 2000 como el ligando de un nuevo receptor de interleucinas (Ozaki *et al.*, 2000; Parrish-Novak *et al.*, 2000). La IL-21 pertenece a la familia de citoquinas de cadena común gamma (γ_c), que incluye otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010).

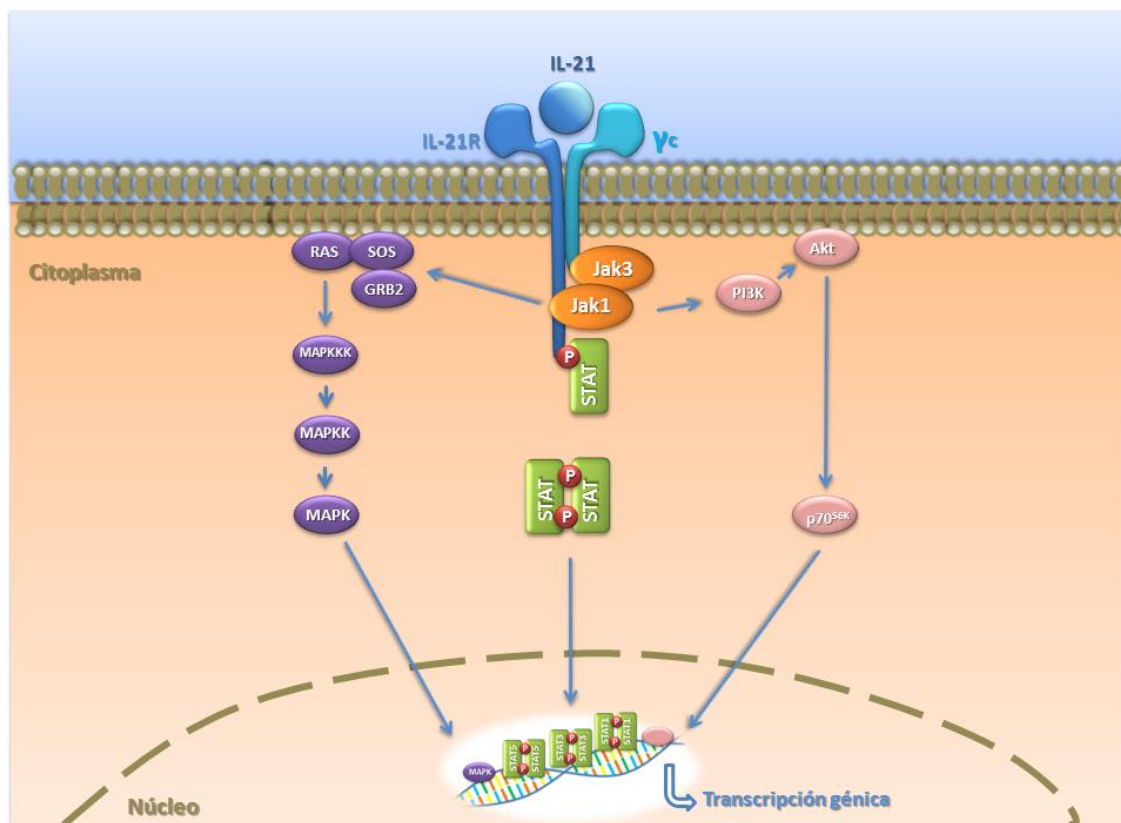
Como miembro de esta familia, presenta la **estructura** común de las citocinas de la familia γ_c . Se trata de una proteína glicosilada compuesta, en humanos, por 131 aminoácidos (Parrish-Novak *et al.*, 2000).

La principal **fente celular** productora de IL-21 es la población de linfocitos T colaboradores activados (Parrish-Novak *et al.*, 2000). Varios linajes de células Th pueden producir IL-21, incluidos los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Tfh, siendo estos últimos los mayores productores de IL-21. No obstante, otros tipos celulares también pueden producir esta citocina, como las células NKT (Coquet *et al.*, 2007).

El **receptor** de la IL-21 fue descrito como un receptor de citocina de tipo I (Ozaki *et al.*, 2000; Parrish-Novak *et al.*, 2000). Pertenece a la familia de receptores de citocina con cadena γ_c , de modo que se trata de un heterodímero que posee la cadena de unión específica al ligando, IL-21R, y la cadena común γ_c (Ozaki *et al.*, 2000; Asao *et al.*, 2001; Habib *et al.*, 2002). Este receptor se expresa de forma constitutiva en linfocitos B y células NK, mientras que en las células T fundamentalmente se expresa tras su activación (Ozaki *et al.*, 2000; Parrish-Novak *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2004). Además, el receptor de la IL-21 se expresa en DCs, macrófagos, células NKT, células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010). Esta amplia distribución del receptor se corresponde con el amplio abanico de acciones inmunológicas que ejerce la IL-21.

De forma análoga a otros miembros de la familia de receptores γ_c , la **señalización** al interior celular promovida por este receptor conlleva la activación de las enzimas Jak1 (mediante interacción con la subunidad IL-21R) y Jak3 (mediante interacción con la subunidad γ_c) (Ozaki *et al.*, 2000; Asao *et al.*, 2001; Habib *et al.*, 2002) (véase *Figura 11*). Estas interacciones desembocan a su vez en la activación de proteínas STAT. IL-21 activa fundamentalmente STAT3 y STAT1, aunque también débilmente STAT5 (Asao *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2007). Además de la vía Jak/STAT, la IL-21 puede activar otras vías. Principalmente se conocen la activación de las vías MAPKs y PI3K (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010).

Figura 11. Vía de señalización IL-21/IL-21R.



Nota: Representación esquemática de los principales mediadores en la señalización intracelular de la citocina IL-21 a través de la unión a su receptor.

Como se menciona con anterioridad, la **función** de la IL-21 es muy amplia, ya que esta citocina desempeña funciones importantes tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. A través de su participación en ambos tipos de respuesta y dado que es producida por diferentes tipos de linfocitos Th que median respuestas inmunes frente a diversos patógenos, la IL-21 está involucrada en la inmunidad frente a diversas infecciones causadas por diferentes patógenos, como virus y helmintos (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010). Ambos tipos de respuesta inmune pueden ser modulados por la IL-21 ya que ésta actúa sobre diversas células y mediante múltiples vías. Sus efectos pleiotrópicos no sólo dependen del tipo celular, sino también del estado de diferenciación y activación de las células.

Sobre la inmunidad innata regula muchos aspectos a través de la modulación de las funciones de diversas células. Sobre las DCs presenta efectos inhibitorios, ya que inhibe el proceso de maduración y la producción de citoquinas como IL-6, IL-12, IL-1β y TNFα. En relación a las células NK, promueve la proliferación, la producción de IFNγ y la actividad citolítica. Sobre las células NKT, la IL-21 induce su supervivencia y su proliferación. Con respecto a los macrófagos, esta citocina activa la función fagocítica y proteolítica, así como la supervivencia celular. Además, sobre fibroblastos y células epiteliales gástricas, la IL-21 induce la producción de diversas MMPs. (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010).

Por otro lado, la IL-21 muestra también funciones importantes en la respuesta inmune adaptativa, tanto celular como humoral, ya que influye sobre la diferenciación, la adquisición de la función efectora y el mantenimiento de la respuesta de las células T (colaboradoras y citotóxicas) y las células B. Sobre estas últimas, la IL-21 modula diversas funciones (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010). En primer lugar, regula la apoptosis y la proliferación celular, promoviendo o inhibiendo una u otra dependiendo de la estimulación antigénica y la presencia de señales complementarias. Por otro lado, induce la diferenciación terminal de las células B hacia la formación de células plasmáticas, así como el cambio de isotipo de inmunoglobulinas, promoviendo la secreción de IgG1, IgG2b e IgG3, e inhibiendo la secreción de IgE. Relacionado con ello, la IL-21 también está involucrada en la formación de centros germinales. Aunque no se considera necesaria para su formación, si es necesaria para el mantenimiento de los mismos. De manera que, al influir sobre varios aspectos de la célula B y la respuesta humoral, la IL-21 presenta un gran impacto, a corto y largo plazo, sobre el control de la infección.

Además de su función relacionada con las células B, la IL-21 presenta una función destacada sobre las células Th (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010). Esta citocina está implicada en la modulación de la proliferación de estos linfocitos. Además, la IL-21 es capaz de modular la diferenciación de las células Th naïve. En este sentido, su función primordial es la promoción de la diferenciación de los linfocitos Th17, sobre los cuales ejerce una función autocrina induciendo su desarrollo a partir de linfocitos naïve (véase *Bloque III. Apartado 2.*). Sin embargo, esta interleucina también modula las funciones de otras subpoblaciones, fundamentalmente inhibiendo la respuesta de tipo Treg, y amplificando las respuestas de tipo Th2.

Finalmente, la IL-21 también regula la funcionalidad de las células T CD8 (Pelletier y Girard, 2007; Leonard *et al.*, 2008; Spolki y Leonard, 2008; Yi *et al.*, 2010). Sobre este tipo celular, promueve la activación, la diferenciación, la proliferación, la producción de IFN γ , la función citotóxica y la generación de fenotipo memoria.

De manera que, la IL-21 media numerosas funciones que inducen el desarrollo de una respuesta inmune eficaz y completa, ya que involucra todos los tipos de respuesta del SI.

1.3. CITOCINA IL-22

Originalmente descrita como factor inducible derivado de células T relacionado con la IL-10 (IL-TIF, del inglés *IL-10-related T cell-derived Inducible Factor*), la IL-22 fue posteriormente renombrada y agrupada dentro de la familia de citocinas de IL-10 (Dumoutier *et al.*, 2000a; Dumoutier *et al.*, 2000b; Xie *et al.*, 2000), que incluye otros miembros como IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26 (Sabat, 2010).

Con respecto a su **estructura**, la IL-22 humana es una glicoproteína de 146 aminoácidos (Xie *et al.*, 2000), cuya forma funcionalmente activa no se conoce con exactitud. Se ha descrito que ésta podría

ser un monómero (Nagem *et al.*, 2002), pero también se ha sugerido que la IL-22 puede actuar en forma de homodímero (de Oliveira Neto *et al.*, 2008).

Las **fuentes celulares** productoras de IL-22 son numerosas. Esta interleucina se expresa en diferentes tipos de linfocitos T, incluyendo linfocitos de ambos sistemas, SI innato y adaptativo. Su expresión preferente tiene lugar en los linfocitos Th, y en especial en las subpoblaciones Th17 y Th22. Sin embargo, las células NK expresan también la citocina, así como otros tipos celulares, como las células T $\gamma\delta$, NKT y LTi (Wolk y Sabat, 2006; Eyerich *et al.*, 2010; Witte *et al.*, 2010; Sonnenberg *et al.*, 2011; Zenewicz y Flavell, 2011).

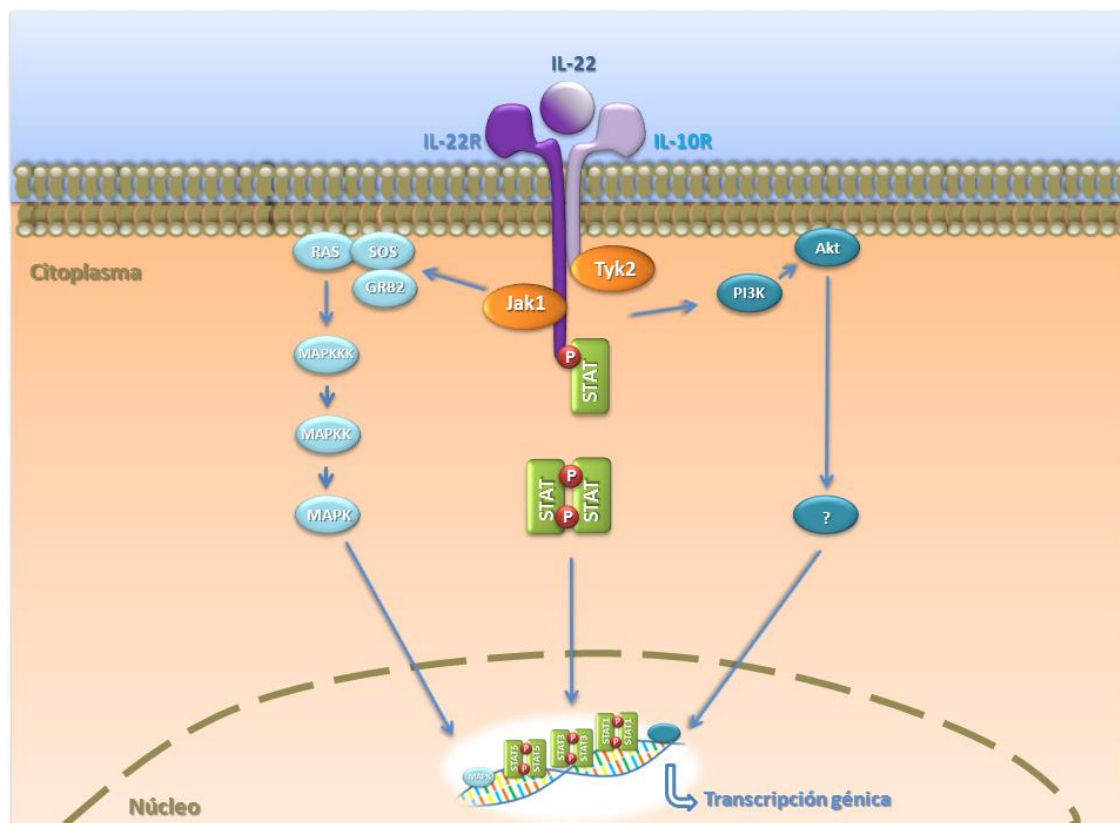
El **receptor** de IL-22 pertenece al grupo de receptores de clase II y está compuesto por un heterodímero, formado por las subunidades IL-22R e IL-10R β (Xie *et al.*, 2000; Kotenko *et al.*, 2001a; Li *et al.*, 2004). Este receptor se encuentra ausente en células inmunes y se expresa fundamentalmente en células epiteliales de la piel y los sistemas gastrointestinal y respiratorio, pero también se localiza en el riñón, el hígado y el páncreas (Wolk *et al.*, 2004; Tachiiri *et al.*, 2003).

Además de la expresión de IL-22R en membrana, se ha descrito la existencia de un receptor soluble para esta citocina, la proteína denominada IL-22RA2 (del inglés *IL-22 Receptor Alpha 2*) o IL-22BP (del inglés *IL-22 Binding Protein*), la cual actúa como un antagonista natural de la IL-22, regulando su biodisponibilidad (Xu *et al.*, 2001; Kotenko *et al.*, 2001b; Dumoutier *et al.*, 2001).

La unión de la citoquina a su receptor induce la activación de diferentes vías de **señalización** (véase Figura 12). Fundamentalmente se produce la activación de la vía Jak/STAT. La IL-22 promueve la activación de Jak1 y Tyk2 y posteriormente STAT3, aunque también media sus efectos a través de STAT1 o STAT5. Sin embargo, la IL-22 media también sus acciones biológicas a través de las vías de señalización de las diferentes MAPKs y la vía PI3K. (Wolk y Sabat, 2006; Eyerich *et al.*, 2010; Sonnenberg *et al.*, 2011; Zenewicz y Flavell, 2011).

La **función** de la IL-22 es clave en la inducción de la respuesta epitelial dirigida frente a los patógenos. Numerosos estudios han mostrado su implicación en la respuesta inmune desarrollada en las mucosas frente a patógenos de diversos tipos (Wolk y Sabat, 2006; Aujla y Kolls, 2009; Eyerich *et al.*, 2010; Witte *et al.*, 2010; Sonnenberg *et al.*, 2011; Zenewicz y Flavell, 2011; Leung y Loke, 2013). El patrón de distribución de su receptor, el cual está mayoritariamente expresado en queratinocitos, hepatocitos y células epiteliales del aparato respiratorio y el sistema digestivo, sugiere la importante función de la IL-22 en las mucosas.

Figura 12. Vía de señalización IL-22/IL-22R.



Nota: Representación esquemática de los principales mediadores en la señalización intracelular de la citocina IL-22 a través de la unión a su receptor.

La IL-22 promueve la respuesta epitelial de las mucosas a través de varios mecanismos. En primer lugar, esta citocina induce la producción de diversos péptidos anti-microbianos, limitando el crecimiento y la diseminación bacteriana. Entre los diferentes péptidos con propiedades anti-microbianas que inducen, se encuentran defensinas β , proteínas S100, proteínas de la familia Reg y lipocalina 2 (Wolk *et al.*, 2004; Boniface *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2006; Wolk *et al.*, 2006; Aujla *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Raffatellu *et al.*, 2009; Sekikawa *et al.*, 2010).

En segundo lugar, la IL-22 presenta una función protectora y regenerativa sobre las células epiteliales, que permite la re-epitelización y regeneración del tejido tras el proceso infeccioso (Wolk y Sabat, 2006; Eyerich *et al.*, 2010; Witte *et al.*, 2010; Sonnenberg *et al.*, 2011; Zenewicz y Flavell, 2011). Fundamentalmente inhibe la activación de las vías de señalización anti-apoptóticas e induce la expresión de proteínas mitogénicas, favoreciendo la supervivencia y la proliferación de las células y permitiendo así la preservación del tejido. En este sentido, numerosos trabajos han mostrado que esta interleucina induce la migración y la proliferación de células epiteliales e inhibe la diferenciación de queratinocitos (Nogralles *et al.*, 2008; Wolk *et al.*, 2006; Aujla *et al.*, 2008; Boniface *et al.*, 2005).

Sumados a los mecanismos de acción descritos, la IL-22 promueve sus acciones anti-bacterianas y reparadoras a través de la inducción de otras moléculas de diversos tipos. Numerosos trabajos han descrito que IL-22 induce la expresión de proteínas de fase aguda (como proteína amiloide A sérica o proteína de fase aguda 1), MMPs (como MMP1, MMP3 o MMP9) o moléculas pro-inflamatorias como

citoquinas (como TNF α , IL-6 o G-CSF) y quimiocinas (como CXCL1, CXCL5, CXCL8 o CXCL9), entre otras (Wolk y Sabat, 2006; Aujla y Kolls, 2009; Eyerich *et al.*, 2010; Witte *et al.*, 2010; Sonnenberg *et al.*, 2011; Zenewicz y Flavell, 2011; Leung y Loke, 2013).

De modo que, la IL-22 actúa como mediador de comunicación entre las células Th17 y las células residentes de tejido, promoviendo la inducción de una respuesta inmune epitelial, así como la conservación de la integridad de la barrera epitelial durante y tras la infección.

1.4. OTRAS CITOCINAS SECRETADAS POR LAS CÉLULAS Th17

Los linfocitos Th17 tienen la capacidad de secretar otras moléculas, fundamentalmente citocinas, que están también involucradas en las funciones desempeñadas por estas células.

La **IL-26** es una de estas citocinas, aunque únicamente se secreta en las células Th17 humanas (Wilson *et al.*, 2007; Manel *et al.*, 2008). Por la distribución de sus receptores, que se encuentran en células epiteliales tales como los queratinocitos y las células epiteliales del colón (Hör *et al.*, 2004), se cree que esta citocina puede ser importante en la respuesta inmune desarrollada en la piel y el tracto gastrointestinal. De hecho, se ha descrito que la IL-26 induce el aumento de la expresión de varias quimiocinas y citocinas en las células epiteliales intestinales (Dambacher *et al.*, 2009; Braum *et al.*, 2012). Además, promueve la proliferación y la supervivencia de las células epiteliales gástricas (You *et al.*, 2013). De esta manera, esta citocina contribuye al proceso inflamatorio intestinal desencadenado en respuesta a la infección.

La citocina **GM-CSF** es otra citocina liberada al medio por las células Th17 (Langrish *et al.*, 2005; Codarri *et al.*, 2011; El-Behi *et al.*, 2011). Su función característica, por la que recibe su nombre, es la inducción del crecimiento de granulocitos y macrófagos. Sin embargo, es capaz de ejercer otras funciones. En relación a su acción sobre los linfocitos Th17, se ha descrito que esta citocina puede promover, a través de la inducción de la secreción de citocinas en APCs, la generación y la activación de estas células (El-Behi *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2011; Ko *et al.*, 2014). Su producción por las células Th17 se ha asociado al fenotipo patogénico y la acción pro-inflamatoria desempeñada por estas células (véase Bloque III. Apartado 3.1.).

Por otro lado, los linfocitos Th17 también presentan la capacidad de secretar la quimiocina **CCL20** (Hirota *et al.*, 2007a; Wilson *et al.*, 2007). Se ha descrito que CCL20 presenta funciones antimicrobianas y quimioatrayentes (Hoover *et al.*, 2002). Esta citocina es el ligando del receptor de quimiocinas denominado CCR6, el cual se expresa en diferentes células, como linfocitos T, B y DCs (Schutyser *et al.*, 2003). Las células Th17 expresan CCR6 en la membrana, por lo que son susceptibles a la acción de CCL20 (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007a; Annunziato *et al.*, 2007; Hirota *et al.*, 2007a). De manera que estas células son capaces de regular su propio reclutamiento a través de la secreción de CCL20.

Además de la quimiocina y las citocinas descritas, las células Th17 tienen la capacidad de secretar otras, las cuales pueden cooperar también en el desarrollo de la función de la subpoblación Th17. Todas ellas actúan de forma conjunta, e incluso sinérgica en muchas ocasiones, promoviendo el desarrollo de la respuesta inmune frente a la infección. Sin embargo, cabe reseñar que, a pesar de los efectos beneficiosos que desempeñan en la defensa del huésped, la secreción de estas citocinas se ha asociado también al desarrollo de procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes (véase *Bloque III. Apartado III.3.1.*). Algunas de estas citocinas se han asociado preferentemente a la adquisición de una capacidad pro-inflamatoria exagerada por parte de las células Th17. De tal modo que, numerosas enfermedades, que cursan con procesos de este tipo, se han relacionado con una respuesta exacerbada de las células Th17.

2. DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCTOS Th17

Como se menciona anteriormente, en un estado homeostático las células Th17 se localizan fundamentalmente en la mucosa intestinal. En tal estado, la microbiota comensal induce el desarrollo de esta subpoblación linfoide al promover la producción de diversas citocinas como IL-6, IL-23 o IL-1 β . Tales citocinas se inducen también en respuesta a agentes infecciosos. Diferentes patógenos estimulan la secreción de estas citocinas y por tanto la inducción del proceso de diferenciación de los linfocitos Th17.



La inducción de la generación de células Th17 por la microbiota comensal o los patógenos tiene lugar a partir de células Th naïve en la periferia. El proceso de diferenciación de los linfocitos Th17 comúnmente se refiere a esta generación *de novo* de las células Th17 en la periferia. Sin embargo, cabe mencionar que algunos investigadores han propuesto la existencia de un proceso de diferenciación de estas células que se desarrolla en el timo (Marks *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). Estos investigadores denominan a las células diferenciadas en esta localización como linfocitos Th17 naturales. De tal modo que proponen que el subconjunto de células Th17 podría subdividirse, de un modo similar a las células Treg, en células Th17 naturales e inducibles, las cuales presentan diferentes requerimientos para su generación, fundamentalmente atendiendo a la señalización mediada por el TCR (Marks *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013a). Se ha propuesto que estas células son funcionalmente distintas de las células Th17 inducibles (Massot *et al.*, 2014) y podrían estar involucradas en el reclutamiento de los neutrófilos en las mucosas del tracto respiratorio (Tanaka *et al.*, 2009). En humanos, se ha identificado una población concreta de células naïve considerada precursora específica de células Th17 naturales (Cosmi *et al.*, 2008; Maggi *et al.*, 2010). Estas células, localizadas en el timo o la sangre del cordón umbilical, se caracterizan fundamentalmente por la expresión en superficie de la glicoproteína CD161 y difieren de otras células naïve en su expresión de ROR γ t, IL-23R y CCR6 (Cosmi *et al.*, 2008; Maggi *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de que estas investigaciones apuntan a la existencia de estos dos subtipos de células Th17, las implicaciones funcionales de cada uno de ellos, así como los requerimientos concretos para su desarrollo aún no se han determinado, por lo que actualmente son objeto de investigación (Zúñiga *et al.*, 2013).

El proceso de diferenciación de las células Th17 es un proceso secuencial y complejo que involucra múltiples citocinas, vías de señalización y factores de transcripción. Es, además, un proceso fuertemente regulado, que puede ser modulado (potenciado o inhibido) por diversos reguladores, entre los que se encuentran diferentes citocinas y factores de transcripción.

2.1. CITOCINAS NECESARIAS PARA LA DIFERENCIACIÓN Th17

Tras la publicación del recién descubierto subconjunto Th17, rápidamente se mostró cuáles eran las citocinas que requerían las células Th17 para su diferenciación (véase *Tabla 2*). En el año 2006, tres estudios independientes revelaron que la combinación de **TGFβ** e **IL-6** causaba la inducción de las células Th17 a partir de células naïve (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). TGFβ se había descrito previamente como una citocina necesaria para el desarrollo de las células Treg, gracias a la inducción de Foxp3 (Chen *et al.*, 2003a). De tal modo que en ausencia de IL-6 las células naïve se dirigían hacia el fenotipo regulador, pero en presencia de IL-6 se diferenciaban a la subpoblación Th17 (Bettelli *et al.*, 2006). De modo que, la IL-6 se estableció como una citocina clave en la decisión de la célula Th naïve hacia célula Treg o Th17.

Tabla 2. Citocinas involucradas en la diferenciación de las células Th17.

Especie	Citocina	Referencias bibliográficas
Ratón		
	TGFβ	Betelli <i>et al.</i> , 2006; Ivanov <i>et al.</i> , 2006; Mangan <i>et al.</i> , 2006; Veldhoen <i>et al.</i> , 2006.
	IL-6	Betelli <i>et al.</i> , 2006; Mangan <i>et al.</i> , 2006; Veldhoen <i>et al.</i> , 2006.
	IL-1β	Sutton <i>et al.</i> , 2006a; Veldhoen <i>et al.</i> , 2006; Kryczek <i>et al.</i> , 2007; Chung <i>et al.</i> , 2009; Ghoreschi <i>et al.</i> , 2010; Ikeda <i>et al.</i> , 2014.
	TNFα	Sutton <i>et al.</i> , 2006a; Veldhoen <i>et al.</i> , 2006.
	IL-21	Korn <i>et al.</i> , 2007; Nurieva <i>et al.</i> , 2007; Wei <i>et al.</i> , 2007; Zhou <i>et al.</i> , 2007.
	IL-23	Aggarwal <i>et al.</i> , 2003; Murphy <i>et al.</i> , 2003; Langrish <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2007; Zhou <i>et al.</i> , 2007; McGeachy <i>et al.</i> , 2009.
Humano		
	TGFβ	Manel <i>et al.</i> , 2008; Volpe <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2008a.
	IL-6	Acosta-Rodríguez <i>et al.</i> , 2007b.
	IL-1β	Acosta-Rodríguez <i>et al.</i> , 2007b; Wilson <i>et al.</i> , 2007; Cosmi <i>et al.</i> , 2008; Lee <i>et al.</i> , 2010.
	IL-21	Yang <i>et al.</i> , 2008a.
	IL-23	Chen <i>et al.</i> , 2007; Wilson <i>et al.</i> , 2007; Cosmi <i>et al.</i> , 2008; Manel <i>et al.</i> , 2008; Volpe <i>et al.</i> , 2008.

Nota: La tabla refleja los trabajos que describen la implicación de cada una de las citocinas en la diferenciación de las células Th17 en ratones y en humanos.

Todos estos estudios fueron llevados a cabo sobre células Th17 murinas. Los primeros trabajos realizados en humanos mostraron diferencias en el requerimiento de TGF β , indicando que esta citocina no era necesaria para la diferenciación de células Th17 humanas (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007b; Chen *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007). Sin embargo, posteriormente, otros autores mostraron que TGF β era esencial en la diferenciación de estas células en humanos (Manel *et al.*, 2008; Volpe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a). No obstante, después se sugirió que la presencia de esta citocina durante la diferenciación era también dispensable para el caso de las células murinas (Das *et al.*, 2009; Ghoreschi *et al.*, 2010), mostrando por tanto que TGF β ejercía un efecto indirecto sobre el proceso de diferenciación. La primera hipótesis que se barajó para explicar estas discrepancias sugirió éstas se debían a las diferentes condiciones de experimentación, en relación al uso o no de suero. Posteriormente, se ha postulado que el requerimiento o no de esta citocina varía en función del origen de las células de estudio (Annunziato y Romagnani, 2011).

Los estudios que permitieron caracterizar la función de las citocinas TGF β e IL-6 pusieron de manifiesto también la implicación de la citocinas **IL-1 β** en el proceso de diferenciación de los linfocitos Th17 (Veldhoen *et al.*, 2006). En el mismo año, se describió que los ratones deficientes en el receptor de la IL-1 β presentaban una baja inducción de la generación de células Th17, evidenciándose así la importante implicación de esta citocina (Sutton *et al.*, 2006a). Paralelamente, los trabajos acerca de la diferenciación en humanos mostraron también una fuerte implicación de la misma en el proceso, actuando sola o en cooperación con otras citocinas (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007b; Wilson *et al.*, 2007; Cosmi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

Estos trabajos permitieron también identificar la función inductora de **TNF α** sobre el proceso de diferenciación, actuando en cooperación con la IL-1 β en la inducción de IL-17 (Sutton *et al.*, 2006a; Veldhoen *et al.*, 2006).

Una vez identificadas estas citocinas, seguidamente se reveló también la función de la citocina **IL-21** como factor promotor del desarrollo de las células Th17 (Korn *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008a). Sin embargo, algunos estudios mostraron que su presencia durante el proceso de diferenciación era dispensable (Coquet *et al.*, 2008; Sondenegger *et al.*, 2008a). Los primeros trabajos mostraron que esta citocina se producía en grandes cantidades en los propios linfocitos Th17, en comparación con otros subconjuntos Th, por lo que se describió que la IL-21 constituía un factor autocrino capaz de establecer un bucle de auto-amplificación en el proceso de diferenciación (Korn *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008a).

En un primer momento se consideró a la **IL-23** como la citocina conductora del proceso de diferenciación de las células Th17. Tal conclusión fue sostenida dado que se había publicado previamente que ésta citocina promovía la producción de IL-17 y la expansión de las células Th activadas productoras de esta citocina (Aggarwal *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005). Sin embargo, esta conclusión fue rápidamente desechada tras conocerse que los linfocitos Th naïve no

presentaban el receptor para la misma y que esta citocina era incapaz de promover la generación de células Th17 a partir de estos linfocitos. Una vez descubierta que su función no estaba implicada en los procesos tempranos de la diferenciación de estas células se evaluó su posible papel sobre la misma. Así, fue establecida su función principal para el desarrollo completo y sostenido de los linfocitos Th17, caracterizándola como la citocina causante de la expansión y estabilización de esta subpoblación (Zhou *et al.*, 2007; McGeachy *et al.*, 2009).

Por tanto, a diferencia de los procesos de diferenciación de Th1 o Th2, donde una única citocina es la principal responsable del proceso, en el caso de las células Th17 son múltiples las citocinas que intervienen en la diferenciación. De modo que, este proceso es muy complejo y necesita de la combinación de varias de ellas para que se produzca de forma completa.

2.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN NECESARIOS PARA LA DIFERENCIACIÓN Th17

En paralelo al estudio de las citocinas, los diferentes trabajos pusieron de manifiesto cuáles son aquellos factores de transcripción que están involucrados en la diferenciación de las células Th17. Así fue identificado en primer lugar el factor de transcripción ROR γ t, el cual fue definido como el regulador maestro de esta subpoblación Th (Ivanov *et al.*, 2006). A pesar de ser descrito como el factor de transcripción principal en este proceso, ROR γ t no actúa de forma aislada, sino que coordina la actividad de varios factores de transcripción esenciales en la diferenciación de las células Th17.

El factor de transcripción **ROR γ t** (o su homólogo humano RORC) pertenece a la familia de receptores para el ácido retinoico ROR, compuesta por RORA, RORB y RORC (Jetten *et al.*, 2001). ROR γ t es una variante transcripcional de ROR γ que se expresa en linfocitos T (He *et al.*, 1998). Se ha descrito que ROR γ t se expresa selectivamente en las células Th17 (Ivanov *et al.*, 2006). Su función en la diferenciación de estas células es esencial ya que desencadena su programa transcripcional característico. Este factor de transcripción es necesario y suficiente para la expresión de las citocinas características de esta subpoblación IL-17, IL-17F e IL-22 (Ivanov *et al.*, 2006; Ichiyama *et al.*, 2008; Manel *et al.*, 2008; Volpe *et al.*, 2008). Destaca entre ellas, la IL-17, que es la citocina más características de estas células. Con respecto a ella, se ha mostrado que este factor de transcripción induce su producción ya que es capaz de unirse directamente al promotor del gen *IL-17* (Ichiyama *et al.*, 2008). Además de la inducción de las citocinas, ROR γ t promueve también la expresión de IL-23R (Ivanov *et al.*, 2006), promoviendo así no sólo las fases tempranas de la diferenciación, sino también la estabilización del linaje Th17.

A pesar de la importante función que se ha descrito para ROR γ t, la diferenciación de los linfocitos Th17 requiere también de la presencia de otros factores de transcripción. **ROR α** (o su homólogo humano RORA) es otro factor de transcripción, perteneciente a la misma familia, el cual también se expresa de forma selectiva en las células Th17 (Yang *et al.*, 2008b). Presenta una función muy similar, aunque no idéntica, a la de ROR γ t (Yang *et al.*, 2008b). Ambos muestran una acción

sinérgica, análoga y redundante en la generación de las células Th17 y su inhibición conjunta conlleva la inhibición total de la generación de estas células (Yang *et al.*, 2008b).

Asimismo, **STAT3** es también un factor de transcripción crucial en la diferenciación de las células Th17, a pesar de que su expresión no es exclusiva de esta subpoblación Th. Su importante implicación en este proceso se debe a que STAT3 está implicado en la regulación global de los programas de expresión génica de los linfocitos Th17 (Harris *et al.*, 2007; Mathur *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Esta gran importancia en la generación de estas células queda manifiesta cuando la expresión de este factor se encuentra ausente o alterada, como es el caso de los individuos que padecen el síndrome de Hiper-IgE, anteriormente mencionado, o los ratones deficientes en su expresión (Harris *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007). Las citocinas que promueven la diferenciación de estas células, como la IL-6, la IL-21 o la IL-23, activan preferentemente STAT3. Su activación promueve fuertemente la diferenciación Th17 dado que este factor de transcripción está involucrado en la regulación de la expresión de varias moléculas asociadas a las células Th17, como son IL-17, IL-17F, IL-21, IL-21R, IL-22, IL-23R y ROR γ t (Nurieva *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Durant *et al.*, 2010). Para el caso de las citocinas IL-17 e IL-17F, se ha descrito que STAT3 se une directamente a los promotores de los genes que las codifican (Chen *et al.*, 2006). Además de promover la expresión del factor de transcripción ROR γ t, se ha puesto de manifiesto que STAT3 y ROR γ t cooperan en la producción de IL-17 (Zhou *et al.*, 2007). De modo que ambos factores de transcripción actúan en conjunto promoviendo el desarrollo de las células Th17.

La actuación conjunta de los factores de transcripción, así como la participación de varios de ellos, refleja también la complejidad del proceso de diferenciación de las células Th17. Este proceso implica la activación de una compleja red de factores de transcripción activados a través de diferentes vías de señalización intracelulares. Esta red está formada no sólo por los factores anteriormente descritos, sino que otros factores de transcripción también están involucrados en la diferenciación de estas células, aunque desempeñan funciones menos relevantes. Estos factores de transcripción actúan como moduladores del proceso, regulándolo positiva o negativamente.

2.3. RELACIONES RECÍPROCAS EN LA DIFERENCIACIÓN Th17 Y Treg

La diferenciación de los linfocitos Th17 y Treg está fuertemente relacionada (véase *Figura 13*). De hecho, se ha descrito la existencia de un precursor común para ambas subpoblaciones, el cual surge durante una fase muy temprana en la diferenciación en la que las células Th naïve co-expresan los factores de transcripción Foxp3 y ROR γ t (Ichiyama *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008b; Zhou *et al.*, 2008). El proceso de diferenciación de ambas subpoblaciones presenta moduladores comunes que muestran relaciones recíprocas con cada una de ellas. Un modulador clave en la diferenciación de ambos subconjuntos es TGF β es necesario para la diferenciación de las células Treg así como los linfocitos Th17. Sin embargo, esta citocina modula de forma diferencial la generación de cada una de las subpoblaciones ya que la concentración necesaria TGF β en cada caso es diferente. La diferenciación de

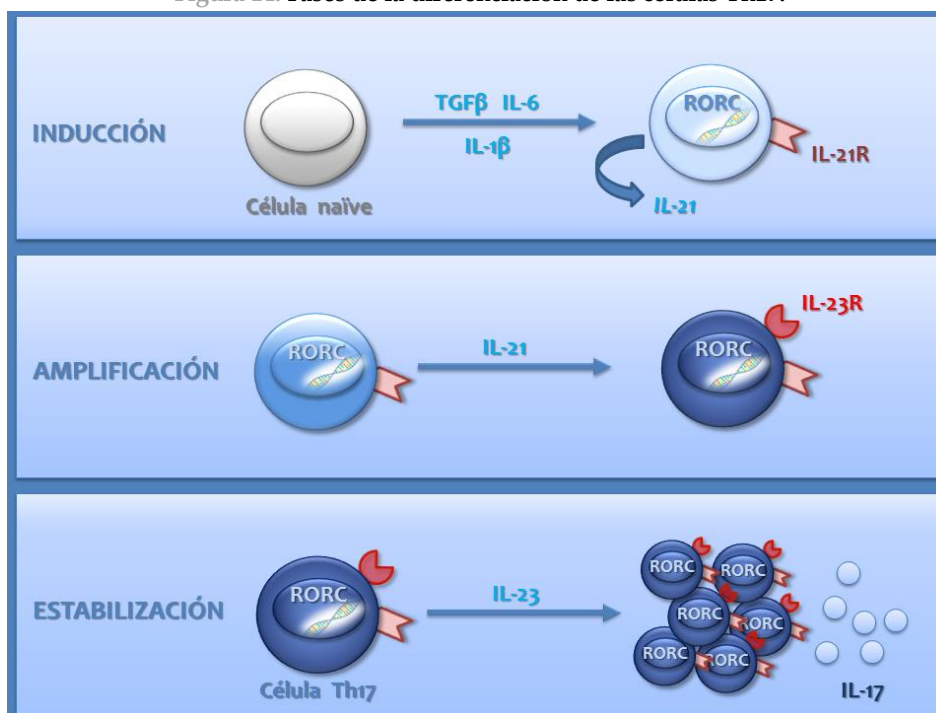
las células Treg se favorece a altas concentraciones de la citocina, mientras que se necesita una baja concentración para la diferenciación de las células Th17, ya que altas concentraciones inhiben este proceso (Zhou *et al.*, 2008). Además de TGF β , otras moléculas son moduladores clave en el proceso de diferenciación de ambas subpoblaciones, entre las cuales se encuentran diversos factores de transcripción. Los factores de transcripción STAT5 y STAT3 ejercen funciones antagónicas y competitivas sobre la diferenciación de cada uno de los subtipos, Treg y Th17 respectivamente (Laurence *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Por su parte, AhR es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación tanto de células Treg como de linfocitos Th17, dependiendo del ligando que lo active (Quintana *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011). Paralelamente, Runx1 es otro factor de transcripción asociado a la diferenciación de ambos tipos celulares ya que puede interactuar con Foxp3 y con ROR γ t, de tal modo que su unión a uno u otro factor de transcripción permite el desarrollo de las células Treg o Th17 respectivamente (Zhang *et al.*, 2008). Se ha caracterizado que su función es necesaria para el proceso de re-diferenciación de las células Treg hacia un fenotipo Th17, ya que permite la expresión sostenida de Foxp3, ROR γ t e IL-17 (Li *et al.*, 2012a). Conjuntamente, el factor de transcripción IRF4, implicado en los procesos de diferenciación de varios subtipos Th, se expresa también en ambos tipos celulares, Treg y Th17 (Brüstle *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009). Otro factor de transcripción modulador recíproco de la diferenciación de ambas subpoblaciones es el propio Foxp3. Este factor de transcripción tiene la propiedad, no sólo de promover el desarrollo de las células Treg, sino de inhibir la generación de células Th17, ya que se une directamente a los factores de transcripción ROR γ t y ROR α impidiendo su actividad transcripcional (Zhou *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008b; Ichiyama *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008). En suma, todos estos moduladores están implicados en el desarrollo recíproco de ambas subpoblaciones de forma antagónica, de tal modo que la generación de una subpoblación modula negativamente la generación de la otra.

A pesar de este antagonismo entre los procesos de diferenciación de ambas subpoblaciones, las células Treg maduras pueden re-diferenciarse hacia células Th17 (véase *Figura 13*). Diversos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, han mostrado esta conversión de los linfocitos Treg murinos y humanos hacia células Th17. La re-diferenciación en sentido inverso, es decir, desde células Th17 hacia un fenotipo Treg, no se ha mostrado en igual medida. No obstante, se ha descrito que los linfocitos Th17 pueden adquirir un fenotipo T regulador (Hoechst *et al.*, 2011; Obermajer *et al.*, 2014). El proceso de conversión de las células Treg hacia Th17 presenta múltiples moduladores entre los que destacan citocinas como IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-23, IL-21 e IL-15 (Xu *et al.*, 2007; Koenen *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008b; Baban *et al.*, 2009; Beriou *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2009; Deknuydt *et al.*, 2009; Leveque *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Voo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Nyirenda *et al.*, 2011). Contrariamente, existen también moduladores negativos de este proceso de conversión, tales como el ácido retinoico (Yang *et al.*, 2008b) o la enzima Indolamino-2,3-dioxigenasa (IDO) (Baban *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Fallarino *et al.*, 2012).

Nota: Representación esquemática de la interrelación en el proceso de diferenciación de las células Treg y Th17. Se muestran las principales citocinas, factores de transcripción y otros mediadores involucrados en los procesos de diferenciación de ambas subpoblaciones, así como en el proceso de re-diferenciación de las células Treg hacia el fenotipo Th17.

En el caso de la subpoblación Th17, se han definido claramente las tres fases de la diferenciación, en cada una de las cuales participan las distintas citocinas (véase *Figura 14*). La fase de inducción de la diferenciación está fundamentalmente mediada por TGF β , IL-6 e IL-1 β ; la fase de amplificación tiene lugar gracias a la acción de la citocina IL-21; y la fase de estabilización se desarrolla a través de la citocina IL-23. Todo ello tiene lugar de forma secuencial, de manera que las citocinas que participan en una fase promueven la acción de las citocinas de fases posteriores. Por otro lado, en este proceso, además de establecerse una serie de fenómenos secuenciales, se establecen bucles de retroalimentación, ya que varias citocinas promueven su propia expresión o la de su receptor, los factores de transcripción que son activados por las citocinas a su vez promueven la expresión de las mismas, etc. Todo ello da lugar a un proceso complejo, pero ordenado, que permite la generación y la estabilización del linaje diferenciado Th17.

Figura 14. Fases de la diferenciación de las células Th17.



Nota: Representación esquemática de las principales citocinas involucradas en las diferentes fases de la diferenciación de las células Th17.

Durante la **fase de inducción** de la diferenciación las citocinas TGFβ, IL-6 e IL-1β, junto con la estimulación causada por el TCR y las señales co-estimuladoras, dan lugar a la inducción de RORγt, la producción de IL-17 e IL-21, así como la expresión de IL-23R (Bettelli *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006).

TGFβ presenta una función dual en la diferenciación de la subpoblación Th17, siendo inductora a bajas dosis e inhibidora a dosis elevadas (Zhou *et al.*, 2008). Su función inhibidora tiene lugar ya que es capaz de reprimir la actividad transcripcional de RORγt, inhibir la expresión de IL-17 e IL-23R y favorecer la expresión de Foxp3 induciendo un fenotipo Th regulador (Chen *et al.*, 2003a; Manel *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008b; Zhou *et al.*, 2008). Además, TGFβ inhibe la producción de una de las citocinas efectoras de las células Th17, la IL-22 (Chen *et al.*, 2007; Volpe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a). Sin embargo, la presencia de otras citocinas implicadas en este proceso de diferenciación, como IL-6, IL-1β o IL-21, es capaz de subsanar los efectos de la represión ejercida por TGFβ y promover el programa transcripcional de las células Th17 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Korn *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007; Manel *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a; Ikeda *et al.*, 2014). No obstante, a pesar de su función inhibitoria, TGFβ presenta una función esencial en la inducción de la diferenciación de estos linfocitos, ya que promueve este proceso a través de múltiples vías. Esta citocina induce la expresión de RORγt, RORα e IL-23R (Mangan *et al.*, 2006; Manel *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Además, TGFβ es necesario para mantener la respuesta en la célula a IL-6. Mientras la activación del TCR o la exposición a IL-6 inhiben la expresión de IL-6Rα, TGFβ induce su expresión, promoviendo así las acciones de esta citocina (Malhotra *et al.*, 2010). Asimismo, TGFβ es capaz de inhibir la expresión, inducida por IL-6 e IL-21, de SOCS3, un inhibidor de STAT3 (Qin *et al.*, 2009). Esto da lugar al aumento de la activación de

STAT3, lo que en último término induce el programa transcripcional de estas células. Por otro lado, TGF β es esencial en la generación de los linfocitos Th17 ya que inhibe la expresión de T-bet y GATA3, bloqueando así la posibilidad de las células naïve de diferenciarse hacia los subtipos Th1 y Th2 (Yang *et al.*, 2008a; Das *et al.*, 2009; Santarlasci *et al.*, 2009).

Por su parte, la IL-6 presenta también funciones importantes en el desarrollo de estas células. Como se describe con anterioridad, junto con TGF β , esta citocina desencadena el programa transcripcional propio de las células Th17, regulando la expresión de diferentes moléculas, entre ellas el *master regulator* ROR γ t y el receptor para IL-23 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). La IL-6 además induce la expresión de IL-21 (Nurieva *et al.*, 2007), lo que permite que la primera fase de la diferenciación induzca la segunda fase de la misma.

Así mismo, la IL-1 β , sola o en cooperación con otras citocinas, promueve mayoritariamente la expresión de ROR γ t, IL-17 e IL-22, entre otras moléculas (Sutton *et al.*, 2006a; Veldhoen *et al.*, 2006; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007b; Kryczek *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009; Ghoreschi *et al.*, 2010; Ikeda *et al.*, 2014).

La **fase de amplificación** depende de la expresión de la IL-21. Durante esta fase la IL-21 coopera con TGF β e IL-6 para inducir la expresión de ROR γ t e IL-23R, así como la producción de IL-17 e IL-21, causando una autorregulación positiva (Korn *et al.*, 2007; Nurieva *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008a; Zhou *et al.*, 2008). Esta citocina puede ser considerada como un nexo de unión entre la primera fase, ya que es inducida por la IL-6 y la fase de estabilización, ya que promueve la respuesta de las células a la IL-23.

La **fase de estabilización** de la diferenciación es promovida, por tanto, por las primeras fases de la misma, ya que las citocinas involucradas en tales fases inducen la expresión del receptor de IL-23, favoreciendo así la respuesta de la célula a IL-23. Además de la acción inductora de las citocinas TGF β , IL-6, IL-1 β e IL-21 sobre la expresión de IL-23R (Mangan *et al.*, 2006; Nurieva *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Manel *et al.*, 2008; Volpe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a), la expresión de este receptor depende también de ROR γ t (Ivanov *et al.*, 2006). Finalmente, tal expresión también se induce por la propia IL-23, la cual establece un bucle de retroalimentación positiva (Chen *et al.*, 2007; Manel *et al.*, 2008). Además de IL-23R, la IL-23 promueve la expresión de IL-17, IL-17F e IL-22 y ROR γ t (Chen *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007), causando la adquisición completa y estable del fenotipo Th17.

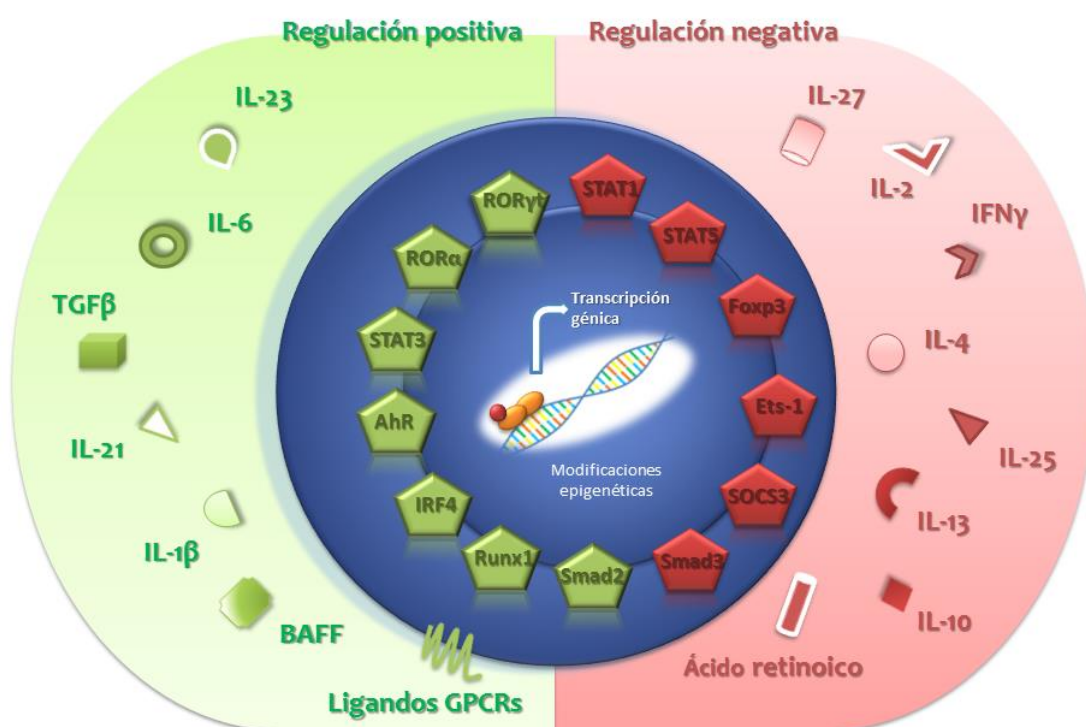
2.5. REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN Th17

El proceso de diferenciación de los linfocitos Th17 es un proceso fuertemente regulado. Numerosos factores intervienen en la regulación, afectando positiva o negativamente a la generación de las células Th17 (véase *Figura 15*). La regulación positiva es importante puesto que estas células muestran una función destacada en la defensa del huésped. Por otra parte, dado el potencial

patogénico de las células Th17, la regulación negativa es también importante para limitar su función pro-inflamatoria, evitando el desarrollo de una respuesta inflamatoria Th17 exagerada que pueda desencadenar la aparición de una enfermedad inflamatoria crónica o autoinmune.

La regulación ejercida sobre el proceso de diferenciación de las células Th17 se lleva a cabo fundamentalmente a través de **citocinas**. Su efecto modulador puede involucrar mecanismos directos e indirectos. De forma directa, las citocinas intervienen a través de su unión a los receptores expresados en las células naïve o en las células Th17. Actúan en proceso de diferenciación, modulando el programa transcripcional a través de varias vías de señalización. Por otro lado, pueden actuar de manera indirecta fundamentalmente inhibiendo la producción por parte de las células inmunes de las citocinas inductoras de la diferenciación Th17 o promoviendo el desarrollo de otras subpoblaciones. Diferentes citocinas están involucradas en la regulación de este proceso, las cuales son capaces de modularlo positiva o negativamente. La regulación positiva se ejerce principalmente a través de las citocinas descritas anteriormente como promotoras de la diferenciación. Sin embargo, existen otras citocinas que ejercen efectos de menor relevancia, como por ejemplo el factor activador de células B (BAFF, del inglés *B-cell Activating Factor*) (Lai Kwan Lam *et al.*, 2008).

Figura 15. Regulación de la diferenciación de las células Th17.



Nota: Representación esquemática de los principales factores moduladores de la diferenciación de las células Th17.

Por otra parte, existen varias citocinas que ejercen efectos inhibidores sobre la diferenciación de las células Th17. Interleucinas como IL-27, IL-2, IFNγ e IL-4, que participan en la diferenciación de las subpoblaciones Th1, Th2 o Treg, son inhibidoras de la diferenciación del subconjunto Th17. La citocina **IL-27** es el antagonista más destacado de la generación de las células Th17, sobre las cuales ejerce un potente efecto inhibidor (Stumhofer *et al.*, 2006; Stumhofer y Hunter, 2008). Esta interleucina

actúa directamente suprimiendo la expresión de ROR γ t y IL-17 de manera dependiente de STAT1 (Batten *et al.*, 2006; Stumhofer *et al.*, 2006; Neufert *et al.*, 2007; Liu y Rohowsky-Kochan, 2011). Además la IL-27 ejerce efectos indirectos sobre la diferenciación de las células Th17 ya que promueve, en presencia de TGF β , la generación de células Treg (Awasthi *et al.*, 2007).

La **IL-2** es otra citocina cuyo efecto inhibitor sobre la generación de las células Th17 es ampliamente conocido (Stockinger, 2007). Su acción inhibitor se logra a través de varios mecanismos de acción, que afectan directamente a las células Th17 o indirectamente a través de la inducción de otros subtipos Th. De forma indirecta, la IL-2 regula generación de las células Th17 ya que induce la diferenciación de la subpoblación Th1 mediante el aumento de la expresión de T-bet e IL-12R β 2 (Liao *et al.*, 2011), lo cual en última instancia genera inhibición de la diferenciación de estas células por regulación cruzada entre subpoblaciones Th. Además, la IL-2 es capaz de inducir la generación de células Treg promoviendo la expresión de Foxp3 a través de la inducción de la expresión de STAT5, regulando así el balance Treg/Th17. Esta inducción de la expresión de STAT5 también ejerce un efecto directo sobre las células Th17 que conduce a la inhibición de la transcripción de IL-17 (Laurence *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Así mismo, sobre las células Th17, la IL-2 inhibe la señalización mediada por la IL-6 (Liao *et al.*, 2011).

Como se describe con anterioridad, las diferentes subpoblaciones linfoides ejercen entre sí mecanismos de regulación cruzada, impidiendo unas el desarrollo de las otras (véase *Bloque II Apartado 1.7.2.*). En esta línea, las citocinas **IFN γ** e **IL-4**, características de las subpoblaciones Th1 y Th2 respectivamente, son inhibitoras de la generación de células Th17 (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Además, otras citocinas relacionadas de la subpoblación Th2, como **IL-25** e **IL-13**, también inhiben el desarrollo de las células Th17 de manera indirecta a través de la inhibición de la expresión de IL-23 e IL-1 β (Kleinschek *et al.*, 2007).

Finalmente, la **IL-10**, cumplidamente conocida por sus propiedades inmunomoduladoras sobre la diferenciación de los linfocitos Th efectores. Las células Th17 expresan el receptor para esta citocina a través del cual la IL-10 puede inhibir la proliferación de esta subpoblación (Huber *et al.*, 2011). Las propias células Th17 pueden producirla estableciendo así posiblemente un mecanismo de auto-regulación (McGeachy *et al.*, 2007).

La regulación llevada a cabo por las citocinas da lugar a la activación y/o inhibición de determinados **factores de transcripción**, los cuales regulan el proceso de diferenciación de los linfocitos Th17. Algunos de ellos son reguladores positivos y otros reguladores negativos del mismo. Entre los reguladores positivos se encuentran factores de transcripción como AhR, IRF4 y Runx1, entre otros.

AhR es un factor de transcripción inductor de la diferenciación de las células Th17. Se ha descrito que AhR se expresa de forma preferente en las células Th17 y su activación, la cual es inducida por las citocinas que conducen la diferenciación TGF β , IL-6, IL-21 o IL-23, aumenta

especialmente la expresión de IL-22, pero también la de IL-17A y IL-17F (Kimura *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008b; Veldhoen *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2010). No obstante, su expresión no se limita a la subpoblación Th17, por lo que está relacionado con otros subconjuntos como las células Treg y Th22 (Quintana *et al.*, 2008; Trifari *et al.*, 2009).

Por su parte, el factor de transcripción **IRF4**, aunque no se expresa de forma exclusiva en los linfocitos Th17, presenta una función notable promoviendo su desarrollo (Brüstle *et al.*, 2007). Este factor de transcripción es importante para la expresión de IL-17 e IL-21 (Chen *et al.*, 2008a; Biswas *et al.*, 2010). Destaca su función sobre esta última citocina, ya que IRF4 promueve tanto su expresión como su señalización durante el proceso de diferenciación de las células Th17 (Huber *et al.*, 2008). Se ha descrito que su función sobre esta citocina la desempeña en cooperación con el factor de transcripción STAT3 (Kwon *et al.*, 2009).

En paralelo, el factor de transcripción **Runx1** es también un factor inductor de la diferenciación de los linfocitos Th17. Concretamente, se ha mostrado que Runx1 induce la expresión de ROR γ t e interacciona con él promoviendo la expresión de la IL-17 (Zhang *et al.*, 2008). Sin embargo, Runx1 también puede interaccionar con los factores de transcripción Foxp3 y T-bet, lo que puede influenciar negativamente en el desarrollo de las células Th17 (Zhang *et al.*, 2008; Lazarevic *et al.*, 2011).

Otro factor de transcripción que actúa como modulador positivo de la diferenciación de estas células es **Smad2** (Malhotra *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2010). Se ha mostrado que puede actuar como co-factor de ROR γ t mediando la expresión de los genes característicos de las células Th17 (Martinez *et al.*, 2010).

Finalmente, al igual que los factores de transcripción descritos, muchos otros factores también son capaces de promover el desarrollo de estas células, tales como los denominados BATF, HIF1 α , miembros de la familia NF κ B y CREM α (Dong, 2008; Hirahara *et al.*, 2010; Hwang, 2010; Kurebayashi *et al.*, 2013).

Por otro lado, existen también numerosos factores de transcripción capaces de regular de forma negativa la diferenciación de los linfocitos Th17. Como en el caso de las citocinas, existe también una regulación cruzada entre subpoblaciones Th a nivel de los factores de transcripción otras (véase *Bloque II. Apartado 1.7.2.*). De tal modo que, factores de transcripción como Foxp3 o Ets-1, característicos de células Treg y Th1, respectivamente, influyen negativamente sobre la transcripción de estas células. Se ha descrito que **Foxp3** es capaz de antagonizar la actividad de ROR γ t y ROR α inhibiendo por tanto el programa transcripcional de las células Th17 (Du *et al.*, 2008; Ichiyama *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008b; Zhou *et al.*, 2008). Por su parte, **Ets-1** también inhibe la generación de las células Th17, posiblemente a través de un mecanismo que involucre la producción de IL-2 (Moisan *et al.*, 2007).

Otros factores de transcripción que participan en la regulación negativa de la generación de las células Th17 pertenecen a la familia STAT. Varios factores de transcripción STAT median los efectos

inhibitorios de diversas citocinas sobre la diferenciación de estos linfocitos. Como se describe con anterioridad, la IL-27 media sus efectos a través de la activación de **STAT1**, el cual ejerce una acción inhibitoria sobre la generación de esta subpoblación linfoide (Batten *et al.*, 2006; Stumhofer *et al.*, 2006; Liu y Rohowsky-Kochan, 2011). La IL-2 sin embargo actúa a través de la activación de **STAT5** (Laurence *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Este factor de transcripción modula fuertemente la función de STAT3. STAT5 compite con STAT3 en su unión al promotor del locus *IL-17a-IL-17f* desplazándolo e impidiendo por tanto la transcripción de estas citocinas (Yang *et al.*, 2011).

Así mismo, los factores de transcripción de la familia Smad también pueden modular de forma negativa la diferenciación linfoide Th17. Se ha mostrado que el factor de transcripción Smad3 actúa como inhibidor de la diferenciación Th17 al inhibir la actividad transcripcional de ROR γ t (Martinez *et al.*, 2009).

Finalmente, otros factores de transcripción que influyen negativamente en la generación de los linfocitos Th17 son los denominados Eomes o eomesodermina, LXR, TCF-1 o PPAR, entre otros (Dong, 2008; Hirahara *et al.*, 2010; Hwang, 2010; Kurebayashi *et al.*, 2013).

Sumado a todos los mecanismos de regulación anteriormente descritos, se encuentran otros mediadores, de diversos tipos, del proceso de diferenciación. En primer lugar, al igual que el resto de los linfocitos Th, la diferenciación de las células Th17 también se ve afectada por la señal recibida a través del TCR y la co-estimulación, mediada por moléculas co-estimuladoras como ICOS y CD40 (Bauquet *et al.*, 2009; Iezzi *et al.*, 2009; Purvis *et al.*, 2010). Por otro lado, las **modificaciones post-transcripcionales**, las cuales, como se menciona con anterioridad, son moduladoras de los procesos de diferenciación de los linfocitos Th, se han asociado a la regulación de la diferenciación de los linfocitos Th17 (véase *Bloque II. Apartado 1.6.*). Por ejemplo, se ha descrito la importancia de la regulación llevada a cabo por los microRNAs sobre las células Th17 (Wei y Pei, 2010). Por otro parte, otros moduladores de la diferenciación de estas células son metabolitos producidos por el metabolismo celular. Además de los ya mencionados metabolitos que actúan como ligandos de AhR, un conocido regulador negativo de la diferenciación de estas células es el **ácido retinoico** (Cassani *et al.*, 2012; Raverdeau y Mills, 2014). Se trata de un metabolito de la vitamina A que regula negativamente la diferenciación de las células Th17, a la que promueve la diferenciación de las células Treg (Mucida *et al.*, 2007; Schambach *et al.*, 2007; Elias *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008). Es capaz de inhibir la inducción de la diferenciación de las células Th17 mediada por la IL-6 e IL-23, y promover, a través de TGF β , la generación de células Treg (Mucida *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). Por último, otro tipo de moduladores de la diferenciación de la subpoblación Th17 son moléculas que señalizan a través de receptores de tipo GPCRs. Una de estas moléculas es el fosfolípido esfingosina 1 fosfato, el cual es abundante en la sangre y actúa como regulador de la salida de los linfocitos de las estructuras linfoides así como del tráfico de linfocitos T (Matloubian *et al.*, 2004). Se ha descrito que este fosfolípido, a través de su señalización mediante su receptor GPCR, participa en el aumento de la expresión de IL-17 (Huang *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2007). Otra molécula que señaliza a través de este tipo de receptores es PGE2. Se

trata de otra clase de lípido conocido ampliamente por su importante implicación en la inflamación. Se ha mostrado que PGE2 incrementa la expresión de IL-17 y CCL20 (Chizzolini *et al.*, 2008; Boniface *et al.*, 2009). En base a estos hallazgos, se ha postulado que posiblemente otras moléculas que señalicen a través de esta clase de receptores tengan efectos similares (O'Shea *et al.*, 2009).

En suma, la diferenciación de las células Th17 es un proceso fuertemente regulado que implica numerosos moduladores, inductores o inhibidores, así como numerosas vías de señalización y factores de transcripción.

3. HETEROGENEIDAD Y PLASTICIDAD DE LOS LINFOCTOS Th17

Una vez diferenciadas, las células Th17 se caracterizan por la expresión una serie de marcadores fenotípicos propios que han adquirido durante el proceso de diferenciación. Aunque las células Th17 son clásicamente definidas por su expresión de IL-17, estas células expresan varias moléculas de diversos tipos que las distinguen a partir de otros linajes de células T efectoras. Se trata de moléculas que presentan una expresión estable en las células Th17 efectoras o de memoria. En las células Th17 humanas, las moléculas mejor caracterizadas como marcadores fenotípicos son, en primer lugar, el factor de transcripción ROR γ t (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007a; Annunziato *et al.*, 2007). Además, el receptor de quimiocinas CCR6 se ha definido como un marcador específico de linaje para esta subpoblación linfoide (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007a; Annunziato *et al.*, 2007). Dado que este marcador se encuentra predominantemente expresado en los linfocitos Th17, permite distinguir a estas células de las demás Th, con la excepción de las Treg (Kleynietfeld *et al.*, 2005). Así mismo, la expresión de IL-23R también se ha caracterizado como un marcador fenotípico asociado específicamente a los linfocitos Th17 (Annunziato *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007). Finalmente, la molécula CD161, se ha designado también como un marcador del fenotipo Th17 (Cosmi *et al.*, 2008; Maggi *et al.*, 2010). La expresión de esta molécula está relacionada con la expresión elevada de CCR6, ROR γ t e IL-23R (Cosmi *et al.*, 2008). Todos estos marcadores fenotípicos definen de forma general la subpoblación linfoide Th17. No obstante, esta subpoblación se caracteriza por mostrar un alto grado de heterogeneidad y plasticidad fenotípica. Aunque se ha descrito que las células Th17 generadas *in vivo*, a diferencia de las generadas *in vitro*, mantienen la expresión de IL-17 comportándose como células Th17 de memoria estables (Lexberg *et al.*, 2008), sin embargo de forma general se ha sugerido que estas células no son estables, sino que necesitan ayuda del microambiente para mantener su programa transcripcional. De manera que, a pesar de presentar características propias de linaje, el subconjunto de células Th17 efectoras exhibe una gran inestabilidad fenotípica una vez diferenciado (Annunziato y Romangnani, 2010; Peck y Mellins, 2010b; Basu *et al.*, 2013). Esta inestabilidad conlleva que, por un lado, dentro de la subpoblación Th17 no todas las células muestran un fenotipo idéntico. Y, por otro lado, una vez diferenciadas, estas células muestran una gran habilidad para re-diferenciarse hacia otros linajes. Estas propiedades de heterogeneidad y plasticidad se deben a que las células Th17 retienen la capacidad de expresar factores de transcripción y citocinas características de otros linajes. La inestabilidad fenotípica se encuentra fuertemente asociada a la presencia de

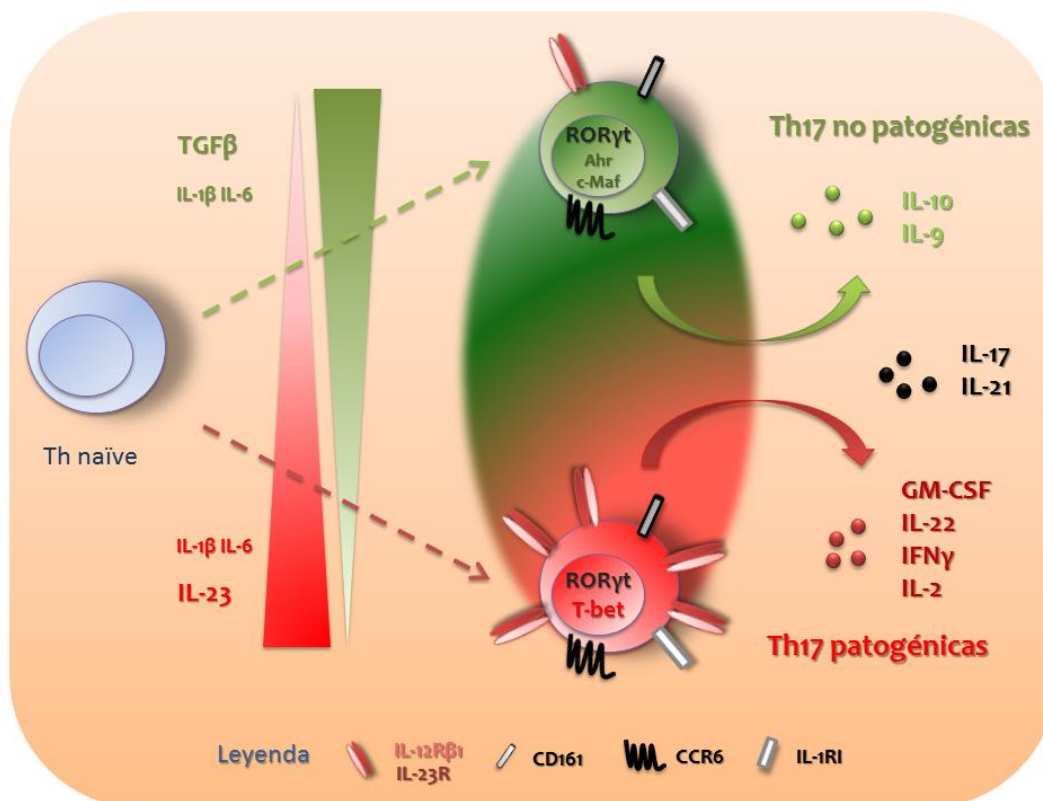
modificaciones epigenéticas, las cuales regulan la estabilidad/inestabilidad del programa transcripcional de esta subpoblación. Las Th17 presentan facilidad para perder su configuración epigenética, permitiéndose así la re-diferenciación hacia otros subtipos (Wei *et al.*, 2009; Mukasa *et al.*, 2010). De este modo, la inestabilidad de las modificaciones epigenéticas de los loci *IL-17a* e *IL-17f* permite que la expresión de estas citocinas características de las células Th17 se pueda extinguir perdiendo así estas células su fenotipo funcional (Mukasa *et al.*, 2010). Estas modificaciones epigenéticas que generan inestabilidad fenotípica se encuentran fuertemente asociadas a los fenómenos de heterogeneidad y plasticidad de los linfocitos Th17. En esta línea, se ha mostrado por ejemplo la relación entre las modificaciones epigenéticas y la expresión de moléculas características de células Th1 por parte de los linfocitos Th17, analizando diferentes marcadores epigenéticos represivos y permisivos en distintos loci, como *Ifn γ* y *Tbx21* (Bending *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2011). Los marcadores bivalentes de histonas del gen *Rorc* en las células Treg constituyen otro ejemplo clave en relación a las modificaciones epigenéticas y su asociación con la plasticidad de las células Treg y Th17. De este modo, las células Treg maduras pueden reprogramar epigenéticamente el locus de este gen, lo que favorece que estas células puedan re-diferenciarse hacia Th17 (Schmidl *et al.*, 2011).

De manera que ambos fenómenos, heterogeneidad funcional y plasticidad se encuentran íntimamente relacionados. Por ejemplo, la IL-23, que promueven la expresión de marcadores asociados a patogenicidad como T-bet o IFN γ promueven también el proceso de re-diferenciación de los linfocitos Th17 hacia el fenotipo Th1, lo cual se ha asociado a mayor inflamación. Mientras, TGF β que inhibe el fenotipo patológico de las células Th17, modula también negativamente la transición de las células Th17 hacia células de tipo Th1. Estas propiedades de heterogeneidad y plasticidad, si bien, no son únicas de este tipo celular, se muestran muy patentes en los linfocitos Th17 y son sujeto de numerosos estudios dada su importante implicación en los procesos inflamatorios y patológicos asociados a esta subpoblación.

3.1. HETEROGENEIDAD DE LOS LINFOCITOS Th17

Los marcadores fenotípicos anteriormente descritos definen de forma general a las células Th17. Sin embargo, a pesar de presentar marcadores comunes, se ha descrito que estas células presentan heterogeneidad respecto a su fenotipo y funcionalidad. Concretamente, varios trabajos han mostrado que estos linfocitos pueden subdividirse en dos subgrupos, denominados como células Th17 no patogénicas (o Th17 clásicas) y células Th17 patogénicas (o Th17 alternativas) (véase *Figura 16*). La base para realizar esta subdivisión es su capacidad o no de desarrollar una respuesta inflamatoria patológica. Cada uno de estos dos subtipos está caracterizado por la presencia/ausencia o el aumento/disminución de la expresión de diferentes marcadores fenotípicos, fundamentalmente citocinas y factores de transcripción. La formación de una u otra clase de linfocitos Th17 depende fundamentalmente de la composición de citocinas presente en el microambiente en el que tiene lugar la generación de las mismas. (Ghoreschi *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2011b; Sallusto *et al.*, 2012).

Figura 16. Heterogeneidad de las células Th17.



Nota: Representación esquemática de las citocinas y factores de transcripción característicos de la heterogeneidad de las células Th17.

Las **células Th17 no patogénicas** se caracterizan por la expresión, además de IL-17 e IL-21, de las citocinas IL-10 e IL-9 (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). En relación a los factores de transcripción, estas células expresan AhR y c-Maf, además de los factores de transcripción propios de la subpoblación (Ghoreschi *et al.*, 2010). Así mismo, se ha descrito que, dadas sus propiedades inmunoregulatoras, las células Th17 no patogénicas podrían expresar *in vivo* el factor de transcripción Foxp3 (Ghoreschi *et al.*, 2010). Por otro lado, además del aumento en la expresión de estos factores de transcripción, en la caracterización del fenotipo no patológico de las células Th17 es clave la ausencia de expresión de T-bet (Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). Este factor de transcripción puede expresarse en las células Th17 y su expresión se ha relacionado con la patogenicidad de las mismas (véase *Aparatado III.3.2.1.*).

La principal citocina que modula la generación de las células Th17 no patogénicas es TGFβ, siendo las células Th17 que se diferencian en presencia de TGFβ e IL-6 las que presentan el fenotipo no patológico incapaz de desarrollar una respuesta inflamatoria patológica (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que la IL-21 también promueve el fenotipo no patológico de estas células (Kastirr *et al.*, 2014).

Por su parte, las **células Th17 patogénicas** se caracterizan fundamentalmente por la expresión de GM-CSF, IL-22, IL-2 e IFNγ, conjuntamente con otras citocinas, entre ellas, las citocinas comunes a ambos fenotipos, IL-17 e IL-21 (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). En

referencia a los factores de transcripción, como se menciona con anterioridad, las células Th17 patogénicas se caracterizan por expresar T-bet, junto con los factores de transcripción comunes de la subpoblación Th17.

El desarrollo de las células Th17 patogénicas se induce en la presencia de IL-23, la cual se ha definido como una citocina crucial en la patología asociada a las células Th17 (Cua *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005; McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010). Su implicación en la capacidad patogénica de las células Th17 ha sido demostrada en numerosos trabajos, de manera que su función protagonista en el desarrollo de las células Th17 patogénicas es unánime. Sin embargo, esta función puede ser apoyada por la presencia de otras citocinas como IL-1 β (Wilson *et al.*, 2007; El-Behi *et al.*, 2011; Zielinski *et al.*, 2012) y TGF β 3 (Lee *et al.*, 2012). Otras citocinas y factores de transcripción distintos a los descritos regulan la expresión de los marcadores que caracterizan a cada uno de los fenotipos de las células Th17, por lo que posiblemente existen otros reguladores de la heterogeneidad de los linfocitos Th17 aún por caracterizar.

3.2. PLASTICIDAD DE LOS LINFOCITOS Th17

Las células Th17 son una población Th definida por presentar una gran plasticidad. La inestabilidad intrínseca que caracteriza a esta subpoblación permite que estos linfocitos puedan re-diferenciarse hacia otras células Th en respuesta a señales específicas del microambiente, fundamentalmente citocinas.

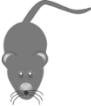

La relación de plasticidad más analizada concierne a la subpoblaciones Th17 y Th1. Sin embargo, también se ha descrito la existencia de plasticidad entre los subtipos Th17 y Th2. La re-diferenciación de las células Th17 hacia células Th2 se ha demostrado asociada a la patogénesis del asma y la infección helmíntica, ambas situaciones relacionadas con la respuesta celular de tipo Th2. Así, las Th17 de memoria procedentes de individuos asmáticos son capaces de re-diferenciarse en respuesta a IL-4 hacia un fenotipo Th2, dando lugar a una subpoblación caracterizada por la co-expresión de IL-17 e IL-4 (Cosmi *et al.*, 2010). Paralelamente, células Th17 en el contexto de una infección causada por *Nippostrongylus brasiliensis* extinguen la expresión de IL-17 y adquieren la capacidad de producir IL-4 (Panzer *et al.*, 2012). Finalmente, también se ha encontrado la existencia de plasticidad entre las células Th17 y las células Tfh. Este proceso de re-diferenciación hacia células Tfh tiene lugar en las placas de Peyer, en donde estas células participan en la inducción de la producción de IgA en los centros germinales (Hirota *et al.*, 2013).

La plasticidad entre los linfocitos Th17 y Th1 es ampliamente conocida. Tal plasticidad se refiere fundamentalmente a la posibilidad de los linfocitos Th17 de re-diferenciarse hacia células de fenotipo Th1. La plasticidad en sentido contrario, es decir, células Th1 que se re-diferencian hacia células Th17 no se ha observado en la mayoría de los trabajos, salvo alguna excepción (Kruschus *et al.*, 2010). Sin embargo, numerosas evidencias procedentes de estudios *in vivo* e *in vitro*, mayoritariamente

en condiciones de inflamación, han puesto en evidencia la conversión de los linfocitos Th17 murinos y humanos hacia células Th1.

Varias citocinas se han visto involucradas en este proceso de re-diferenciación, tanto en células Th17 murinas como humanas (véase *Tabla 3*). No obstante, una citocina está mayoritariamente involucrada en este proceso de re-diferenciación, la IL-12. Esta interleucina causa una extinción de la expresión de IL-17, ROR γ t y ROR α en las células Th17 de forma rápida e irreversible, al mismo tiempo que induce la expresión del programa transcripcional asociado al fenotipo Th1, fundamentalmente promoviendo la expresión de T-bet e IFN γ (Annunziato *et al.*, 2007; Bending *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Kruschus *et al.*, 2010). Por otra parte, la IL-23 también se ha descrito como una citocina implicada en este proceso. Esta citocina induce una progresiva re-diferenciación del subconjunto Th17 dando lugar a una subpoblación que extingue la expresión de IL-17 y expresa IFN γ (Mathur *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 2011). Se ha descrito que la transición de las células Th17 hacia Th1, tanto inducida en presencia de IL-12 como de IL-23, es dependiente de los factores de transcripción T-bet y STAT4. (Mathur *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 2011). Aunque algunos trabajos muestran que la IL-23 es capaz de inducir esta re-diferenciación mediante mecanismos independientes de T-bet (Duhon *et al.*, 2013). Además de estas citocinas, otras citocinas pueden regular este proceso de plasticidad linfoide. IFN γ es una de estas citocinas que participa en la conversión de las células Th17 hacia Th17/1. Esta citocina incrementa la expresión de IL-12R β 2 capacitando a las células a responder en presencia de IL-12, la cual actúa en sinergia con IFN γ promoviendo la expresión de T-bet (Lexberg *et al.*, 2010). También, se ha descrito que TNF α puede conducir el cambio de las células Th17 hacia células Th1 (Maggi *et al.*, 2014). Contrariamente, otras citocinas pueden regular este proceso de forma negativa impidiendo la re-diferenciación de estas células. TGF β , el cual es necesario para mantener la expresión de IL-17, inhibe fundamentalmente la transición inducida por IL-23, aunque presenta también un efecto inhibitor sobre la re-diferenciación inducida por IL-12 (Lee *et al.*, 2009; Kruschus *et al.*, 2010).

Tabla 3. Citocinas involucradas en la plasticidad de las células Th17 hacia Th1.

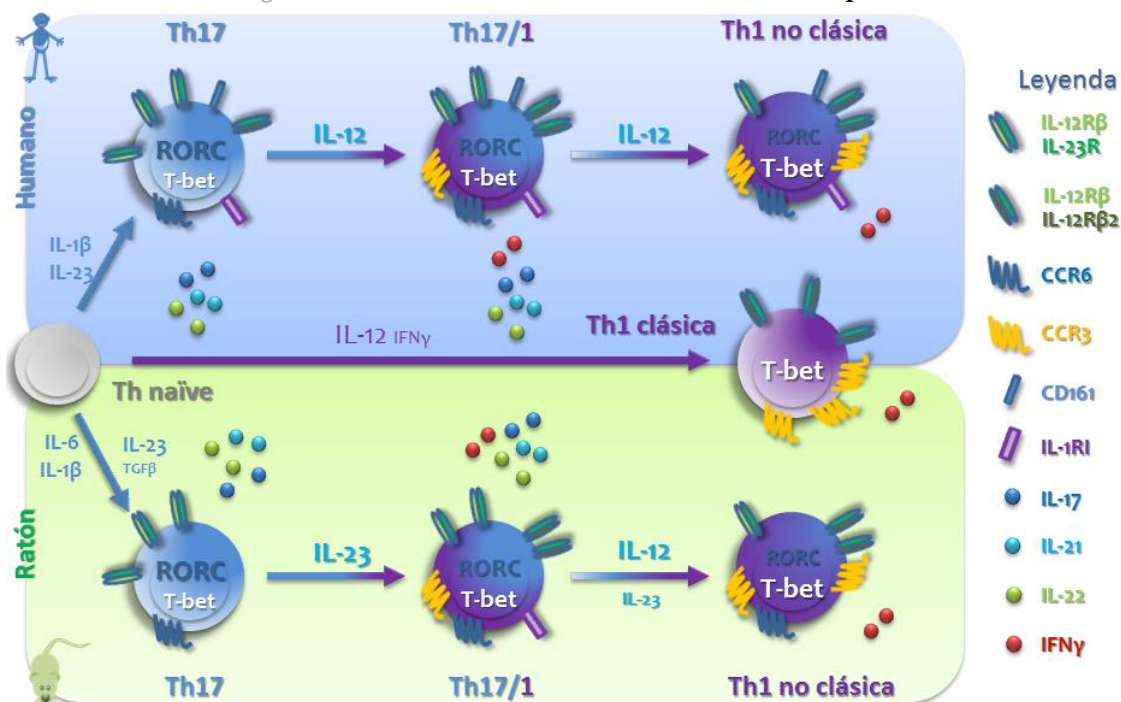
Especie	Citocina	Referencias bibliográficas
Ratón		
	IL-12	Abromson-Leeman <i>et al.</i> , 2009; Bending <i>et al.</i> , 2009; Kruschur <i>et al.</i> , 2010; Lee <i>et al.</i> , 2009.
	IL-23	Mathur <i>et al.</i> , 2008; Abromson-Leeman <i>et al.</i> , 2009; Hirota <i>et al.</i> , 2011; Duhon <i>et al.</i> , 2013.
	IFN γ	Lexberg <i>et al.</i> , 2010.
Humano		
	IL-12	Annunziato <i>et al.</i> , 2007; Cosmi <i>et al.</i> , 2011.
	TNF α	Maggi <i>et al.</i> , 2014.

Nota: La tabla refleja los trabajos que describen la implicación de cada una de las citocinas en la plasticidad de las células Th17 hacia Th1 en ratones y en humanos.

Durante la transición de las células Th17 hacia células Th1 se desarrolla un fenotipo intermedio denominado Th17/1 o Th17/Th1¹ (véase *Figura 17*). Estas células se caracterizan por la expresión de marcadores asociados a ambas subpoblaciones ya que estas células co-expresan IL-17 e IFN γ , así como los factores de transcripción característicos de ambas subpoblaciones ROR γ t y T-bet (Lexberg *et al.*, 2010; Maggi *et al.*, 2012). El proceso de re-diferenciación de las células Th17 termina con la extinción de la expresión de los marcadores asociados a la subpoblación Th17, dando lugar a una población celular con fenotipo Th1. Estas células Th1 se han denominado como células Th1 no clásicas o ex-Th17 para distinguirlas de las células Th1 clásicas (procedentes de la diferenciación de un linfocito Th naïve). Entre las subpoblaciones Th17, Th17/1, Th1 no clásicas y Th1 clásicas existen una serie de marcadores, tanto de superficie como intracelulares, que se expresan de forma diferencial en los distintos tipos celulares. Las subpoblaciones Th17 y Th17/1 difieren entre sí en la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3, el cual no se expresa en las células Th17 y sí en las células Th17/1 (Maggi *et al.*, 2012). Por su parte, las células Th1 no clásicas, además de la expresión de CXCR3, se diferencian de las células Th17 que las originan en que la expresión de algunas moléculas es menor (como IL-1R) y la expresión de otras es mayor (como T-bet o CCR4) (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2007a; Nistala *et al.*, 2010; Maggi *et al.*, 2012). Por otra parte, respecto a las células Th1 clásicas, las células Th1 no clásicas expresan de forma diferencial o a mayores niveles ROR γ t, AhR, CCR6, CD161, IL-23R, IL-17RE e IL-1R (Annunziato *et al.*, 2007; Nistala *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2011; Maggi *et al.*, 2012). Además, estas células Th1 no clásicas presentan una menor expresión de determinadas moléculas como el receptor de quimiocinas CXCR3, propio de las células Th1 clásicas (Maggi *et al.*, 2012).

¹ En la presente Tesis Doctoral se emplea el término Th17/1 para describir fenotipo intermedio entre las subpoblaciones Th17 y Th1, mientras que el término Th17/Th1 se utiliza para referirse al ratio entre ambas subpoblaciones.

Figura 17. Plasticidad de las células Th17 hacia el fenotipo Th1.



Nota: Representación esquemática de la plasticidad de los linfocitos Th17 hacia el fenotipo Th1 en humanos y en ratones. Se muestran las principales citocinas y factores de transcripción involucrados durante la re-diferenciación, así como los principales marcadores fenotípicos y funcionales de las diferentes subpoblaciones linfoides.

La plasticidad de los linfocitos Th17 hacia Th1 se ha relacionado con la patogenicidad de estas células. Concretamente, las células con fenotipo Th17/1 se han encontrado asociadas a enfermedad inflamatoria crónica, sugiriendo el carácter patogénico de estas células. Entre las diferentes patologías que cursan con inflamación crónica, la existencia de la transición de células Th17 hacia células Th1 y/o la presencia de células Th17/1 se ha relacionado con el desarrollo patológico de la enfermedad en pacientes o en modelos experimentales de enfermedades tales como: esclerosis múltiple (Abromson-Leeman *et al.*, 2009; Kruschus *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2011; Duhon *et al.*, 2013), artritis juvenil idiopática (Nistala *et al.*, 2010; Cosmi *et al.*, 2011; Maggi *et al.*, 2012), enfermedad de Crohn (Annunziato *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009) y diabetes autoinmune (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009).

BLOQUE IV: PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

1. NEUROINMUNOMODULACIÓN

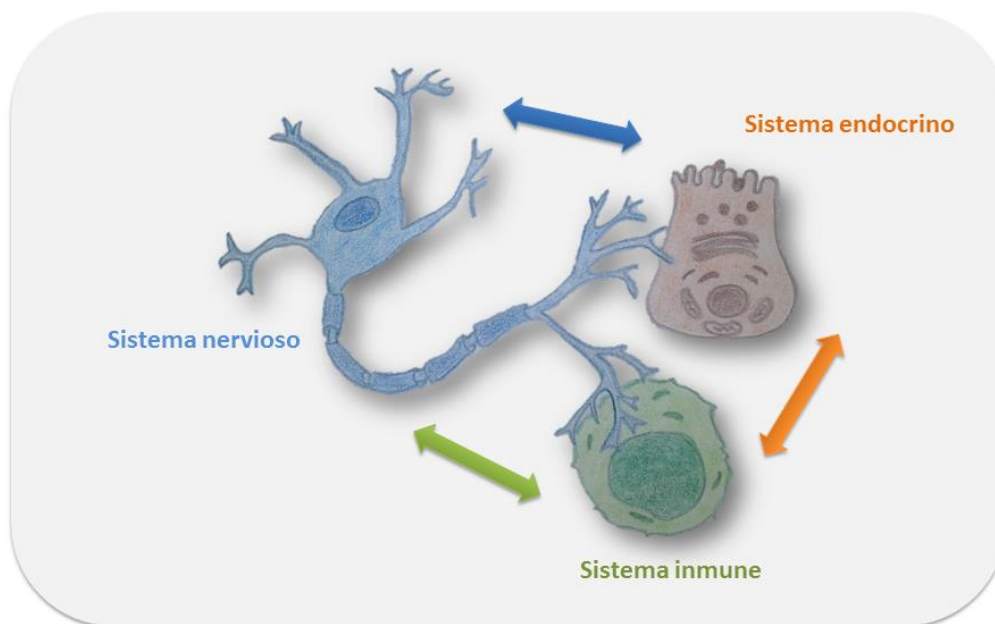
La homeostasis es una propiedad del organismo que consiste en el mantenimiento de la condición interna estable, compensando los cambios que se producen constantemente en el entorno. Se trata, por tanto, de una forma de equilibrio dinámico que se produce gracias a un conjunto de fenómenos de autorregulación, posibles a través de la interconexión entre diferentes sistemas.

Durante muchos años se consideró que los sistemas nervioso, endocrino e inmune funcionaban de forma autónoma en la restauración de la homeostasis inmune. En base a esto, el SI era el encargado de reaccionar frente a la exposición a bacterias, virus y daños tisulares, mientras que el sistema neuroendocrino se encargaba de responder frente a otros estímulos, tales como la temperatura, el dolor o el estrés. Sin embargo, posteriormente se mostró que ambos sistemas están involucrados en respuestas coordinadas, siendo la comunicación entre ellos esencial para la defensa del huésped. Esta relación entre el sistema endocrino, nervioso e inmunológico constituye la base de la neuroinmunomodulación (véase *Figura 18*). Tal y como fue definida por George F. Solomon, la neuroinmunomodulación se dedica al estudio de los mecanismos de interacción y comunicación entre el cerebro y los sistemas responsables del mantenimiento homeostático del organismo, así como de sus implicaciones clínicas (Solomon, 1998). Numerosas investigaciones pioneras en esta área sugirieron la comunicación entre estos sistemas (Metlnikov y Chorine, 1928a; Metlnikov y Chorine, 1928b; Solomon y Moos, 1964). Sin embargo, fue en el año 1975 cuando se acuñó por primera vez el término psiconeuroinmunología (Solomon, 2001). Más adelante, se demostró que la activación inmune desencadena una respuesta en el eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal (HHA). (Besedovsky *et al.*, 1977). Posteriormente, fue descubierto el circuito bidireccional entre los sistemas inmune y endocrino, mostrando que las células inmunes podían también secretar hormonas y neuropéptidos (Blalock, 1984). En la actualidad se conocen muchas facetas acerca de la neuroinmunomodulación gracias a estos y otros muchos aportes provenientes de diversos campos como la neurociencia, la psicología, la inmunología, la biología molecular, la genética, la anatomía, la bioquímica y la microbiología. Sin embargo, aún hoy se trata de un campo de investigación abierto, que presenta amplias proyecciones tanto en la salud como en la enfermedad.

Las relaciones entre los sistemas inmune y neuroendocrino están mediadas por redes complejas que permiten una comunicación constante. Estas redes otorgan la posibilidad de que se establezca un “lenguaje bioquímico” entre diferentes tipos celulares, mediado por diversos moduladores solubles y sus receptores. La comunicación es bidireccional, ya que posibilita el “diálogo biológico” en ambas direcciones, existiendo una regulación mutua entre los diferentes mediadores. Por un lado, cuando se produce una infección o lesión tisular, el SI informa al sistema neuroendocrino a través de la secreción de las citocinas. El efecto de las citocinas sobre el sistema neuroendocrino puede ser directo o indirecto. La acción directa tiene lugar gracias a que las células neuroendocrinas expresan receptores

de citocinas. Un mecanismo indirecto lo constituye la aparición de cambios sistémicos, tales como la hipotensión, que suponen un estímulo estresante que activa el sistema neuroendocrino. Por otro lado, el SI es regulado por el sistema neuroendocrino ya que sus células reconocen neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas producidas por los sistemas nervioso y endocrino. El sistema neuroendocrino desencadena vías moleculares, en general anti-inflamatorias e inmunosupresoras, que limitan la respuesta inmune de forma directa, a través del sistema nervioso autónomo, o mediante el eje HHA (Pozo *et al.*, 2007; Souza-Moreira *et al.*, 2011). La liberación de glucocorticoides a través del eje HHA constituye un ejemplo claro sobre la comunicación bidireccional entre el SI y el sistema neuroendocrino (Sternberg, 2006). La secreción de diversas citocinas como IL-1, IL-6 y TNF α producidas por el SI señala al sistema neuroendocrino. Este sistema responde a la inflamación sistémica secretando la hormona liberadora de corticotropina, la cual estimula la producción de corticotropina que, a su vez, promueve la síntesis y liberación de los glucocorticoides. Finalmente, para completar el ciclo de modulación, los glucocorticoides a su vez regulan al SI a través de sus numerosos efectos anti-inflamatorios.

Figura 18. Neuroinmunomodulación.



Nota: Representación esquemática de las relaciones entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune.

En relación a los moduladores de cada uno de los sistemas, aunque las citocinas se caracterizan como mediadores secretados por el SI y los neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas como mediadores producidos por el sistema neuroendocrino, lo cierto es que existe una interrelación mucho mayor entre ambos sistemas. Así, las células del SI pueden producir también neuropéptidos en respuesta a señales inflamatorias, los cuales actúan de manera autocrina y paracrina a través de sus receptores específicos expresados en las células inmunes (Souza-Moreira *et al.*, 2011). Los neuropéptidos son pequeños péptidos involucrados en la regulación de infinidad de funciones tales como el aprendizaje y la memoria, la ingesta, el comportamiento sexual y el control del dolor. Se trata

de inmunomoduladores ampliamente estudiados, por lo que se han descrito numerosos péptidos con funciones neuroinmunomoduladoras, tales como el péptido intestinal vasoactivo (VIP, del inglés *Vasoactive Intestinal Peptide*) el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP, del inglés *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polipeptide*), la urocortina (UCN), la Sustancia P (SP) y la somatostatina, entre otros. Su implicación en la comunicación entre el sistema neuroendocrino y el SI es de gran importancia, presentando una función esencial en el restablecimiento de la homeostasis inmune. Varios neuropéptidos se liberan en las terminaciones periféricas de los nervios sensoriales y eferentes en las proximidades de las células inmunes en respuesta a diversos estímulos invasivos e inflamatorios. La regulación mediada por neuropéptidos implica la modulación de un amplio espectro de mediadores inflamatorios, regulando la respuesta inmune a diferentes niveles. Presentan acciones inmunomoduladoras tanto anti-inflamatorias como pro-inflamatorias, aunque generalmente son conocidos por sus acciones de tipo anti-inflamatorio. En relación con la inmunidad innata, estos péptidos reducen la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias, a la vez que estimulan la producción de citocinas anti-inflamatorias (Souza-Moreira *et al.*, 2011). Disminuyen también la expresión de otros mediadores inflamatorios como la PGE2, expresados por macrófagos, DCs y células de la microglia (Gonzalez-Rey y Delgado, 2008). Además de estos efectos, los neuropéptidos activan muchas otras vías de modulación, tales como la regulación de la activación de mastocitos (Bot *et al.*, 2010) o la regulación de la quimiotaxis de los neutrófilos (Hafstrom *et al.*, 1993), entre otros. Con respecto a la inmunidad adaptativa, varios neuropéptidos modulan la diferenciación de las células Th, la producción de inmunoglobulinas, etc. Así, por ejemplo, numerosos estudios han mostrado que VIP es capaz de modular de forma diferencial los diversos subtipos de linfocitos Th (Gomariz *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2002a; Voice *et al.*, 2003).

A pesar de que durante los últimos años profusos trabajos acerca de los neuropéptidos y otras áreas de la neuroinmunomodulación han demostrado firmemente la existencia de la comunicación entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico, todavía existen muchas cuestiones que necesitan de un mayor estudio. Por ejemplo, se sabe que las células inmunes son capaces de secretar neuropéptidos, pero aún se necesita precisar la fase de maduración celular en la que se producen, los mecanismos de señalización específicos de cada uno de los efectos observados, las circunstancias fisiológicas concretas que inducen la liberación de los neuropéptidos, etc. Una mayor profundización en esta área podría facilitar respuestas a estas cuestiones y, por tanto, proporcionaría información muy relevante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

2. PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

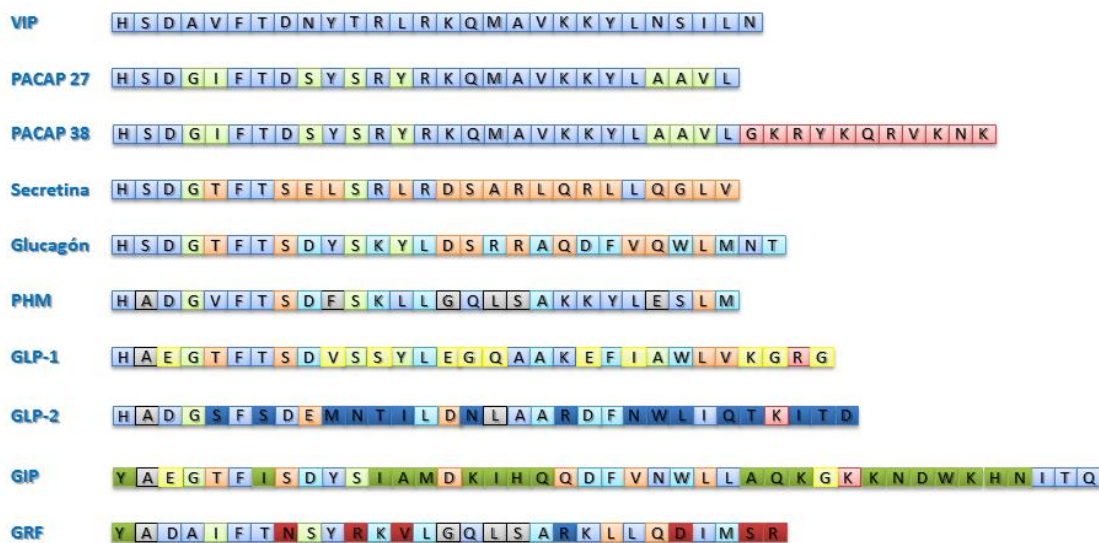
Dentro del conjunto de moduladores anteriormente descritos, se encuentra VIP. Se trata de un neuropéptido ampliamente distribuido que presenta múltiples funciones, entre las cuales se hallan funciones claves en la modulación del desarrollo y la función del SI.

2.1. DESCUBRIMIENTO Y ORIGEN EVOLUTIVO DE VIP

En 1969 los investigadores Said y Mutt descubrieron e identificaron en tejido pulmonar un agente vasoactivo de naturaleza peptídica que causaba vasodilatación sistémica (Said y Mutt, 1969). Este descubrimiento les llevó a buscar moléculas similares en otros órganos. Dado que el intestino delgado y el pulmón tienen un origen embrionario común, comenzaron la búsqueda en dicho tejido (Said, 2007). Fue así como, un año más tarde, se aisló en el intestino delgado porcino un potente péptido hipotensivo al que denominaron VIP (Said y Mutt, 1970a; Said y Mutt, 1970b). Seguidamente el péptido fue purificado y su secuencia fue determinada (Said y Mutt, 1972). Siendo sintetizado un año más tarde (Bodanszky *et al.*, 1973). Aunque fue caracterizado inicialmente en el sistema gastrointestinal, las siguientes investigaciones realizadas por los doctores Said y Rosenberg permitieron su identificación en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), describiendo dicho péptido como neurotransmisor (Said y Rosenberg, 1976). Posteriormente, numerosos trabajos demostraron la existencia de VIP en otros tejidos, definiéndolo como un péptido de amplia distribución (véase *Bloque IV. Apartado 3.*).

El péptido VIP pertenece a una superfamilia de péptidos denominada familia secretina/VIP que comprende nueve miembros, todos ellos relacionados estructural y biológicamente y altamente conservados en la escala evolutiva (Sherwood *et al.*, 2000) (véase *Figura 19*). En humanos, los péptidos pertenecientes a esta familia son: VIP, PACAP (PACAP27 y PACAP38), secretina, glucagón, péptido similar a glucagón 1 (GLP-1, del inglés *Glucagon Like Peptide 1*), GLP-2, péptido histidina-metionina (PHM), hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GRF, del inglés *Growth Hormone-Releasing Factor*) y péptido inhibidor gástrico o péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP, del inglés *Glucose-dependent Insulinotropic Peptide*) (Sherwood *et al.*, 2000). En general, los péptidos de esta superfamilia están relacionados en términos de distribución y función (Sherwood *et al.*, 2000). De todos los péptidos que comprenden esta familia, PACAP es aquel que presenta una mayor homología estructural y funcional con VIP, con el que comparte los mismos receptores. Ambos péptidos muestran un 68% de identidad de secuencia (Vaudry *et al.*, 2000). Para explicar esta elevada homología estructural entre los distintos miembros de la familia, se ha propuesto un origen común a partir de un mismo gen ancestral. De manera que, tras procesos de duplicación génica y mutaciones, se habrían generado las secuencias finales de los diferentes péptidos (Linder *et al.*, 1987; Sherwood *et al.*, 2000).

Figura 19. Familia de péptidos Secretina/VIP.



Nota: Representación esquemática de la estructura aminoacídica de VIP y los péptidos de su familia en humanos.

2.2. GEN VIP

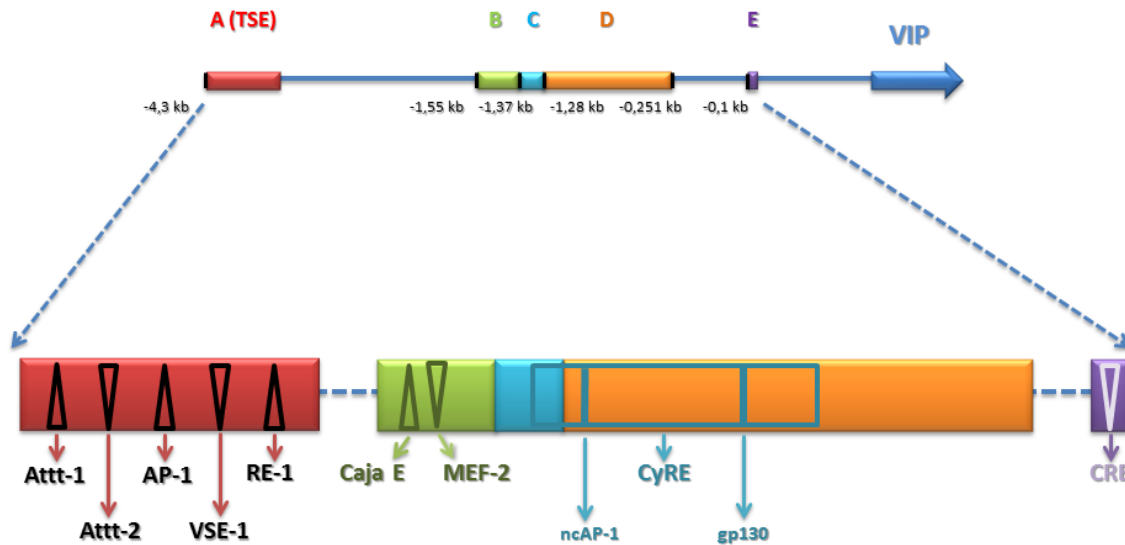
El gen que codifica para el péptido VIP se localiza en humanos en el cromosoma 6 en la región q24. Además de contener la información génica para VIP, este gen codifica también para otro péptido de la familia, el péptido PHM (Itoh *et al.*, 1983; Bodner *et al.*, 1985). Dicho gen está constituido por 8.837 pares de bases (pb) que se organizan en siete exones y seis intrones, cada uno de los cuales codifica para un dominio funcional distinto en el ARNm y la proteína final (Gozes *et al.*, 1984; Tsukada *et al.*, 1985; Gozes *et al.*, 1986; Linder *et al.*, 1987) (véase Figura 20). De tal manera que:

- ❖ El exón I contiene 165 pb y codifica para la región 5' no traducida del ARNm.
- ❖ El exón II presenta 117 pb y codifica para el péptido señal.
- ❖ El exón III consta de 123 pb y codifica para el extremo N-terminal.
- ❖ El exón IV está formado por 105 pb y codifica para el péptido PHM.
- ❖ El exón V presenta 132 pb y codifica para el péptido VIP.
- ❖ El exón VI tiene 89 pb y codifica para el extremo C-terminal.
- ❖ El exón VII presenta 723 pb y codifica para el extremo 3' no traducido del ARNm.
- ❖ En ratones, el gen *VIP* se localiza en el cromosoma 10 en la región A1, presentando una estructura muy similar a la observada en el gen en humano (Lamperti *et al.*, 1991; Sena *et al.*, 1994).

En cuanto a la regulación de la expresión génica de VIP, se han descrito múltiples mecanismos de regulación, lo que permite un fuerte control de la expresión de este péptido. A la izquierda de la región 5' del gen existen varias secuencias reguladoras altamente conservadas. En concreto, se han definido cinco regiones reguladoras o elementos *cis*: el dominio A o elemento de expresión específica

de tejido (TSE, del inglés *Tissue-Specifíer Element*), los dominios consecutivos B, C y D, y el dominio E (Hahm y Eiden, 1998a; Hahm y Eiden, 1998b) (véase *Figura 20*). Cada dominio regulador presenta a su vez diversos elementos reguladores, que pueden ser tanto activadores como inhibidores. Dichos elementos son:

- ❖ Los elementos reguladores de unión a proteínas como Oct-1 y Oct-2 denominados Attt-1 y Attt-2, localizados en el dominio A y considerados indispensables para la activación de la transcripción del gen (Hahm y Eiden, 1998a; Hahm y Eiden, 1998b; Liu *et al.*, 2001).
- ❖ El elemento regulador estimulador de la transcripción que constituye el sitio de unión para AP-1/ets (AP-1, del inglés *Activator Protein-1*; ets, del inglés *E-twenty-six*) perteneciente al dominio A (Liu *et al.*, 2001).
- ❖ La secuencia inhibidora denominada VSE-1 localizada en el dominio A (Liu *et al.*, 2001).
- ❖ El elemento regulador negativo denominado elemento restrictivo 1 (RE-1, del inglés *Restrictive Element-1*) localizado en el dominio A (Hamelink *et al.*, 2004).
- ❖ El elemento de respuesta a acetato de forbol miristato (PMA, del inglés *Phorbol Myristate Acetate*), que constituye un sitio de unión canónico para AP-1. Situado en la posición -2.25 kb, entre los dominios A y B (Hahm y Eiden, 1999).
- ❖ La secuencia reguladora activadora denominada caja E, perteneciente al dominio B (Hahm y Eiden, 1998a; Hahm y Eiden, 1998b).
- ❖ Los elementos reguladores activadores reconocidos por proteínas MEF-2 (del inglés *Myocyte Enhancer Factor-2*), también localizados en el dominio B (Hahm y Eiden, 1998a; Hahm y Eiden, 1998b).
- ❖ El elemento de respuesta a citocinas (CyRE, del inglés *Cytokine-Responsive Element*) localizado en posición -1.33 kb. Este elemento está implicado en la regulación de la expresión del gen mediada por citocinas y por PMA a través de la activación de vías de señalización como la vía Jak/STAT. Perteneciente tanto al dominio C como al dominio D. Presenta un lugar de unión a factores de transcripción STAT, un lugar de unión no canónico para la proteína AP-1 (ncAP-1, del inglés *noncanonical Activator Protein-1*) y un lugar de unión a gp-130 (Symes *et al.*, 1994; Symes *et al.*, 1997; Hahm y Eiden, 1999; Jones *et al.*, 2000).
- ❖ El elemento de respuesta a AMPc (CRE, del inglés *cyclic AMP Response Element*), necesario para la activación de la transcripción génica y localizado en el dominio E (Tusukada *et al.*, 1987; Fink *et al.*, 1988; Hahm y Eiden, 1996).

Figura 20. Región promotora del gen *VIP*.

Nota: Representación esquemática de la región promotora del gen que codifica para *VIP*. La figura muestra los cinco dominios reguladores característicos con sus correspondientes elementos reguladores.

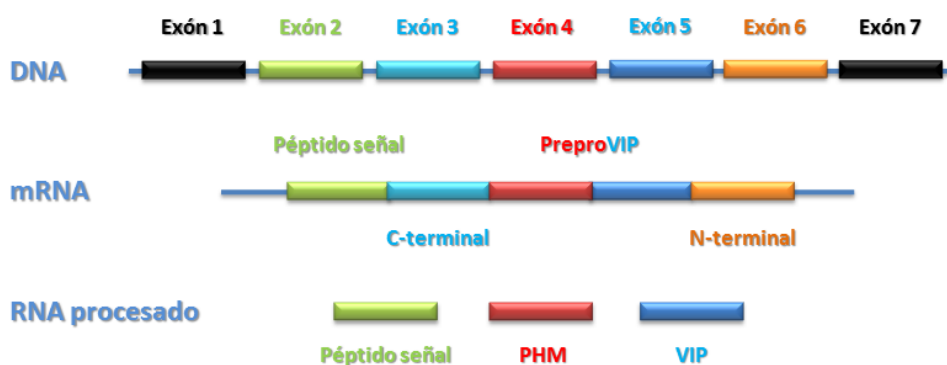
Además de la regulación de la expresión del gen *VIP* asociada a la región reguladora 5', la regulación post-transcripcional es importante en la modulación de la expresión del péptido. Esta regulación implica mecanismos de estabilización y desestabilización del ARNm, tales como la asociación a proteínas citosólicas (Wolford y Sings, 1995) o la poliadenilación. Concretamente, en el caso de la poliadenilación, además de la regulación mediada por la longitud de la cola de poliadeninas (Sachs y Wahle, 1993), existe una regulación dependiente del lugar de poliadenilación. Así, se ha descrito la existencia de dos lugares alternativos de poliadenilación, lo cual podría constituir un mecanismo de regulación de expresión diferencial (Chew *et al.*, 1994; Leceta *et al.*, 1996). Por otro lado, varios trabajos realizados sobre la expresión de *VIP* en ratas y ratones han demostrado la importancia de las regiones no codificantes en posición 3' del gen en la regulación de dicha expresión (Lamperti *et al.*, 1991; Chew *et al.*, 1994; Wolford y Sings, 1995). Estos elementos no codificantes se asocian a diversas proteínas citosólicas, que pueden variar en función del tejido, formando complejos destabilizadores, lo que da lugar a una expresión diferencial de *VIP* dependiente de tejido o línea celular (Chew *et al.*, 1994; Wolford y Sings, 1995).

En suma, esta compleja regulación de la expresión de *VIP* es reflejo de las múltiples señales intra y extracelulares que pueden influir en la expresión fisiológica del péptido. Dicha expresión es controlada por moléculas de diversos tipos, tales como factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas y citocinas, entre otros muchos, que señalizan a través de proteínas cinasas, calcio, AMPc, AP-1, etc. De manera que, todos estos mediadores consiguen regular el patrón de expresión temporal y espacial de *VIP* tanto durante el desarrollo como en el individuo adulto.

2.3. PÉPTIDO VIP

El resultado de la transcripción y la traducción del gen *VIP* es una molécula precursora de alto peso molecular constituida por 170 aminoácidos y denominada preproVIP (Delgado *et al.*, 2004a) (véase *Figura 21*). Este prepropéptido es procesado por proteasas en el retículo endoplasmático dando lugar a un propéptido de 148 aminoácidos llamado proVIP (Delgado *et al.*, 2004a). El propéptido es común para los péptidos VIP y PHM, ya que su escisión enzimática da lugar a VIP-GKR y PHM-GKR (Bloom *et al.*, 1983; Itoh *et al.*, 1983). Ambos son a su vez procesados por enzimas de tipo carboxipeptidasa B generando VIP-G y PHM-G (Itoh *et al.*, 1983). Finalmente, tras la activación de monooxigenasas alfa-amidantes de peptidil-glicinas (PAMs, del inglés *Peptidyl-glycine alpha-Amidating Monooxygenases*), estos precursores dan lugar a VIP y PHM (Delgado *et al.*, 2004a). De manera que, en el caso de VIP, el resultado es un péptido de veintiocho aminoácidos que tiene 3.326 Da de peso molecular.

Figura 21. Procesamiento del péptido VIP.



Nota: Representación esquemática del procesamiento del gen y el mRNA que codifican para los péptidos VIP y PHM.

La estructura primaria de VIP es de naturaleza básica y presenta carácter anfipático. Su secuencia aminoacídica completa se presenta en *Figura 19*. En relación a la estructura secundaria de péptido, VIP adquiere una configuración caracterizada por dos tipos de dominios: una estructura de bobina al azar en la región N-terminal y una estructura en conformación α -hélice en la región C-terminal (Onue *et al.*, 2008). Esta estructura secundaria varía dependiendo de la naturaleza de la solución en la que se encuentra el péptido (Onue *et al.*, 2008). De tal manera que, la estructura puede variar dependiendo del solvente, el pH y la polaridad de la solución utilizada (Fry *et al.*, 1989). De modo general, se puede afirmar que el péptido presenta dos giros β en la región N-terminal, seguidos de dos regiones de estructura en α -hélice, interconectadas por una región de estructura indefinida, que presumiblemente le confiere flexibilidad a la molécula (Fry *et al.*, 1989; Theriault *et al.*, 1991).

Una vez secretado el péptido VIP, su procesamiento es muy rápido. La vida media de dicho péptido en la sangre es de aproximadamente un minuto en humanos (Domschke *et al.*, 1978). Diversos estudios han mostrado que VIP, además de ser hidrolizado de manera espontánea en solución acuosa

neutra (Mody *et al.*, 1994), puede ser rápidamente hidrolizado por numerosas enzimas, entre las que se encuentran las peptidasas (ej: endopeptidasa EC3.4.24.11, dipeptidil peptidasa IV/CD26) (Gourlet *et al.*, 1997a; Lambeir *et al.*, 2011).

3. DISTRIBUCIÓN DE VIP

Una de las características más destacadas del péptido VIP es su extensa localización a lo largo de todo el organismo. Su producción por parte de células del sistema nervioso, endocrino e inmune le confiere su amplia distribución, lo que se refleja en sus efectos pleiotrópicos.

3.1. DISTRIBUCIÓN GENERAL DE VIP

En relación a la distribución de VIP, tal como se menciona con anterioridad, las primeras investigaciones plantearon la hipótesis de que el péptido se producía en células endocrinas del tracto gastrointestinal (Said y Mutt, 1969; Said y Mutt, 1970b). Sin embargo, posteriormente se descubrió su localización en las neuronas pertenecientes a los nervios de la pared gastrointestinal (Said y Rosenberg, 1976). Estudios posteriores localizaron concretamente el péptido en los cuerpos neuronales, axones y dendritas, así como en las terminales nerviosas presinápticas, donde VIP era liberado actuando como un neurotransmisor no adrenérgico ni colinérgico (Fahrenkrug, 1989). En la actualidad se conoce que VIP se encuentra extensamente distribuido en el SNC y SNP (véase *Tabla 4*), habiendo sido identificado como uno de los principales péptidos transmisores en ambos sistemas.

La amplia expresión de VIP en el SNC y SNP le permite actuar como neurotransmisor y neuromodulador en muchos órganos y tejidos, tales como el tracto digestivo, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio, el tracto genitourinario, el sistema excretor y el SI, entre otros (Said, 1991; Gozes *et al.*, 1999; Henning y Sawmiller, 2001). Así, se ha detectado inervación VIPérgica en plexos submucosos del tracto gastrointestinal, corazón, pulmón, uréter, vejiga urinaria, cuerpo cavernoso del pene, riñón, glándula tiroides, entre otros órganos (Henning y Sawmiller, 2001).

Los numerosos trabajos anteriormente descritos confirman la síntesis de VIP en neuronas. Sin embargo, la producción del péptido también se ha descrito en células endocrinas, como por ejemplo las células lactotropas pituitarias (Morel *et al.*, 1982; Chew *et al.*, 1996) o las células prostáticas (Polak y Bloom, 1984; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2003) y en células inmunes, tales como mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos.

Tabla 4. Distribución general de VIP.

Sistema/Órgano/Región	Distribución	Referencias bibliográficas
SNC		
Córtex cerebral	Diferentes tipos celulares: neuronas, astrocitos y células de la vasculatura.	Magistretti y Morrison, 1988.
Hipotálamo, hipófisis y	Neuronas hipotalámicas y células de la hipófisis y la glándula adrenal.	Nussdorfer y Malendowicz, 1998.
Hipocampo y giro dentado	Neuronas pertenecientes al hipocampo y el giro dentado.	Kosaka <i>et al.</i> , 1985.
Glándula pineal	Células de la glándula pineal.	Cozzi, 1999.
Otras regiones	Amígdala, cuerpo estriado, centros vagales de la médula oblonga.	Henning y Sawmiller, 2001.
SNP		
SNP Somático	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Numerosos nervios pertenecientes al sistema nervioso periférico somático, tales como el nervio vago ✓ Algunos nervios motores, como el nervio ciático. 	Henning y Sawmiller, 2001.
SNP Autónomo	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ganglios simpáticos. ✓ Nervios autónomos que inervan a las glándulas exocrinas, epitelios mucosos, musculatura lisa vascular y no vascular. ✓ Grupos ganglionares de cuerpos celulares ganglionares que proporcionan inervación a los distintos órganos. 	Fahrenkrug, 1989; Henning y Sawmiller, 2001.

Nota: Resumen de las principales fibras nerviosas VIPérgicas pertenecientes al SNC y el SNP.

3.2. DISTRIBUCIÓN DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE

Aunque inicialmente el péptido VIP no fue relacionado con el SI, numerosos estudios han mostrado que su amplia distribución conlleva a su vez una extensa distribución dentro de dicho sistema. En el SI, existen dos fuentes de producción de VIP. En primer lugar, VIP es liberado en los órganos linfoides a través de fuentes neuronales, es decir, mediante las fibras nerviosas VIPérgicas pertenecientes al SNP que se distribuyen en dichos órganos. En segundo lugar, el péptido es producido directamente por células pertenecientes al SI.

El origen neuronal de VIP en el SI se ha demostrado gracias a las investigaciones de diferentes grupos. En 1985, Felten y sus colaboradores demostraron por primera vez la presencia de inmunoreactividad para VIP en los terminales nerviosos de la corteza tímica de rata (Felten *et al.*, 1985). Posteriormente, numerosas investigaciones en diversas especies mostraron también la existencia de inervación VIPérgica en bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, del inglés *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*), estableciéndose así un nexo anatómico entre el SNC y el SI (Lundberg *et al.*, 1985; Ottaway *et al.*, 1987; Fink y Weihe, 1988; Ichikawa *et al.*, 1994; Bellinger *et al.*, 1997).

Por su parte, la primera evidencia de la síntesis de VIP en células inmunes fue demostrada por Cutz y sus colaboradores en 1978 con la observación de la producción de VIP en mastocitos procedentes de peritoneo, intestino y pulmón de rata (Cutz *et al.*, 1978). Posteriormente se demostró también la síntesis en otras células del SI como células polimorfonucleares y mononucleares, neutrófilos y basófilos de sangre periférica (O'Dorisio *et al.*, 1980; Lygren *et al.*, 1984), así como en eosinófilos humanos y murinos procedentes de granulomas inducidos por infección con *Schistosoma mansoni* (Aliakbari *et al.*, 1987; Weinstock y Blum, 1990). Fue en el año 1990, gracias al trabajo realizado por la Dra. Gomariz y su grupo de investigación, cuando surgió la primera demostración de la producción de VIP en los linfocitos. En su trabajo, los autores demostraron inmunoreacción para VIP en células linfoides de extractos de timo (Gomariz *et al.*, 1990). Posteriormente caracterizaron la presencia del péptido en linfocitos de timo, bazo y nódulos linfáticos de rata y ratón (Gomariz *et al.*, 1992; Gomariz *et al.*, 1993). Los trabajos siguientes demostraron la síntesis de VIP en timocitos y en linfocitos T y B de órganos linfoides periféricos (Gomariz *et al.*, 1994a; Leceta *et al.*, 1994). Dentro de la población de células T, se encontró expresión de ARNm de VIP en linfocitos T periféricos CD4 y CD8, timocitos dobles positivos y timocitos simples positivos (Leceta *et al.*, 1996). No se observó expresión en timocitos dobles negativos, pero tal expresión fue encontrada por otros autores (Xin *et al.*, 1997). Así mismo, se mostró también la expresión de ARNm de VIP en linfocitos peritoneales de rata (Delgado *et al.*, 1996a). Seguidamente se demostró la liberación del péptido en suspensiones celulares procedentes de timo, bazo, nódulos linfáticos y peritoneo (Martínez *et al.*, 1999). Posteriormente, se evidenció que esta liberación linfoide de VIP tiene lugar en respuesta a la estimulación con agentes que inducen inflamación (LPS, TNF α , IL-6, IL-1 β), apoptosis (glucocorticoides) y estimulación antigénica (Concanavalina A o ConA, LPS, anticuerpo anti-TCR) (Leceta *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 1999a). Así mismo, se mostró que el péptido VIP es capaz de inducir su propia secreción en las células inmunes (Martínez *et al.*, 1999). En relación con la producción diferencial del péptido en los distintos linfocitos Th, se encontró que tras la estimulación antigénica los linfocitos de subtipo Th2, pero no los linfocitos de la subpoblación Th1, son capaces de producir VIP (Vassiliou *et al.*, 2001; Delgado y Ganea, 2001a). Respecto a otras subpoblaciones Th, tales como iTreg o Th17, no se ha demostrado aún si son capaces o no de producir el péptido.

En resumen, todos estos hallazgos manifiestan la amplia distribución del péptido VIP en el SI, con su subsecuente implicación sobre las diferentes acciones llevadas a cabo por las células pertenecientes a este sistema.

4. ACCIONES BIOLÓGICAS DE VIP

Como se expone en el apartado anterior, el péptido VIP presenta una amplia distribución, encontrándose en múltiples tipos celulares de diversos órganos y tejidos. Esta extensa distribución está relacionada con su implicación en la modulación de múltiples acciones biológicas (Said, 1991; Said, 2007).

4.1. ACCIONES BIOLÓGICAS GENERALES DE VIP

Los efectos biológicos del péptido VIP comprenden a los sistemas nervioso, inmune, digestivo, endocrino, cardíaco, vascular, respiratorio y reproductor, en los cuales VIP regula una amplia variedad de procesos fisiológicos (véase *Tabla 5*). Entre ellos se incluyen la vasodilatación sistémica, el gasto cardíaco, la broncodilatación, la relajación de la musculatura lisa, la analgesia, la hiperglicemia, el crecimiento, el metabolismo óseo, la motilidad gástrica, la regulación hormonal, los ritmos circadianos y los procesos de aprendizaje y comportamiento.

Tabla 5. Acciones biológicas generales de VIP.

Sistema/Órgano/Tejido	Efecto biológico de VIP	Referencias
SNC	Efectos generales	
	Analgesia.	Haghjoo <i>et al.</i> , 1996.
	Hipertermina.	Said, 1986.
	Acción hipnótica.	Riou <i>et al.</i> , 1981.
	Efecto anoréxico.	Tachibana <i>et al.</i> , 2004.
	Efectos sobre el comportamiento	
	Modulación de los procesos de memoria y aprendizaje.	Glowa <i>et al.</i> , 1992; Ivanonva <i>et al.</i> , 2012.
	Efectos sobre el hipotálamo	
	Mantenimiento de los ritmos circadianos.	Harmar, 2003.
	Modulación de la liberación de diferentes neuropeptidos.	Vijayan <i>et al.</i> , 1979; Reed <i>et al.</i> , 2002; Tachibana <i>et al.</i> , 2004.
	Regulación de la transmisión sináptica en el núcleo supraquiasmático.	Itri y Colwell, 2003.
	Efectos Neurotróficos	
	✓ Estimulación de la neurogénesis, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia neuronal. ✓ Inhibición de la apoptosis neuronal.	Brenneman y Eiden, 1986; Pincus <i>et al.</i> , 1990; Pincus <i>et al.</i> , 1994; Moody <i>et al.</i> , 2003.
	Neuroprotección.	Dejda <i>et al.</i> , 2005; Gozes y Brenneman, 2000; Brenneman, 2007; Passemard <i>et al.</i> , 2011.
	Efectos sobre la astrogliya y microglia	
	Regulación da la proliferación, plasticidad, metabolismo y biosíntesis de factores neurotróficos y gliotransmisores de las células de la astrogliya.	Sorg y Magistretti, 1992; Masmoudi-Kouki <i>et al.</i> , 2007.
	Inhibición de la producción de mediadores inflamatorios por células de la microglia.	Kim <i>et al.</i> , 2000; Delgado, 2002; Delgado <i>et al.</i> , 2002b; Delgado <i>et al.</i> , 2003.
Sistema endocrino	Efectos sobre la hipófisis	
	Estimulación de la producción de la hormona del crecimiento, la prolactina y la hormona luteneizante.	Vijayan <i>et al.</i> , 1979; Prysor-Jones y Jenkins, 1988; Reichlin, 1988.
	Efectos sobre la glándula tiroides	
	Estimulación de la secreción de hormonas tiroideas.	Ahren <i>et al.</i> , 1980.
	Efectos sobre la glándula suprarrenal	
	Estimulación de la producción de catecolaminas.	Malhotra <i>et al.</i> , 1988.
	Efectos sobre el páncreas	

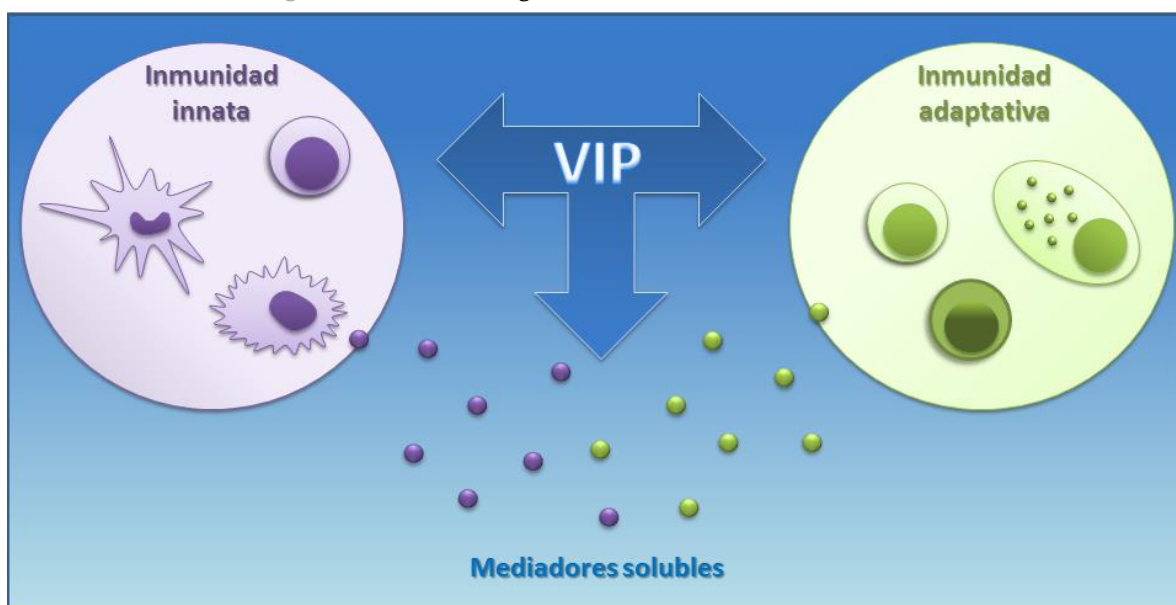
Sistema/Órgano /Tejido	Efecto biológico de VIP	Referencias
	Estimulación de la producción insulina y glucagón.	Jensen <i>et al.</i> , 1978; Winzell y Ahrén, 2007.
	Reducción del estrés oxidativo en las células del acino pancreático.	Fujimori <i>et al.</i> , 2011.
Sistema respiratorio	Broncodilatación.	Palmer <i>et al.</i> , 1986.
	Modulación de la secreción de las glándulas mucosas.	Groneberg <i>et al.</i> , 2001a.
	Regulación del transporte de iones en el epitelio nasal y bronquial.	Rafferty <i>et al.</i> , 2009; Qu <i>et al.</i> , 2011.
	Estimulación de la proliferación en células del epitelio bronquial.	Guan <i>et al.</i> , 2006.
Sistema cardiovascular	Efectos coronarios múltiples: ✓ Efecto inotrópico ✓ Vasodilatación ✓ Regulación del tono vasomotor ✓ Modulación del flujo sanguíneo coronario ✓ Regulación del latido cardíaco	Henning y Sawmiller, 2001.
Aparato reproductor	Vasodilatación.	Ottesen y Fahrenkrug, 1995.
	Estimulación de la esteroidogénesis.	Ottesen y Fahrenkrug, 1995; El-Gehani <i>et al.</i> , 1998a.
	Modulación de la ovulación.	Ottesen y Fahrenkrug, 1995.
	Estimulación de la producción de testosterona.	El-Gehani <i>et al.</i> , 1998b.
	Estimulación de la erección del pene.	Ottesen y Fahrenkrug, 1995.
	Estimulación de la proliferación y diferenciación de células epiteliales prostáticas.	Juarranz <i>et al.</i> , 2001a; Juarranz <i>et al.</i> , 2001; Gutierrez-Cañas <i>et al.</i> , 2005.
Tracto gastrointestinal	Estimulación de la relajación de la musculatura lisa.	Said y Mutt, 1970b.
	Estimulación de la secreción en intestinal.	Olsson y Holmgren, 2001; Burleigh y Banks, 2007.
	Inhibición de la motilidad gástrica e intestinal.	Love <i>et al.</i> , 1988; Olsson y Holmgren, 2001.

Nota: Resumen de las principales acciones biológicas de VIP. Se excluyen en esta tabla las acciones del péptido sobre el SI.

4.2. ACCIONES BIOLÓGICAS DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE

El péptido VIP es sintetizado y secretado en el microambiente local de los órganos linfoides. Allí, VIP puede modular de forma autocrina y paracrina la respuesta inmune, actuando sobre múltiples tipos celulares. VIP modula tanto la inmunidad innata como la adaptativa, siendo su acción predominante de tipo anti-inflamatoria (véase *Figura 22*). En relación a la inmunidad innata, entre otras muchas funciones, VIP inhibe la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias por parte de macrófagos y DCs, reduce la expresión de moléculas co-estimuladoras en APCs, modula la adhesión y la migración macrofágica, etc. En términos de inmunidad adaptativa, VIP regula múltiples funciones biológicas tales como la proliferación linfoide, la adhesión y migración linfocitaria, la producción de inmunoglobulinas o la diferenciación de linfocitos Th.

Figura 22. Efectos biológicos de VIP sobre el sistema inmune.



Nota: Representación esquemática de la acción de VIP sobre las células pertenecientes a la inmunidad innata y la adaptativa, así como sobre los mediadores solubles producidos por ambos tipos de respuestas.

Esta grandísima variedad de acciones biológicas moduladas por VIP, convierte el estudio de sus efectos biológicos en una cuestión compleja. Sumado a ello, se encuentra el hecho de que gran cantidad de investigaciones muestran efectos opuestos (inhibidores y estimuladores) para una misma función. Esta dualidad en el efecto de VIP puede depender del tipo celular o del sistema experimental empleado. No obstante, el efecto puede ser dual incluso para un mismo tipo de célula. Diversas razones se postulan como las causantes de esta discrepancia, siendo el diferente estado de activación celular la principal causa propuesta. Como se menciona anteriormente, el estado de activación células puede influenciar la expresión de los receptores de VIP en las mismas y, por tanto, éste puede determinar la función del péptido sobre la actividad de la célula. Por otro lado, los efectos de VIP sobre la función inmune pueden ser también indirectos, mediados a través de células secretoras, células endoteliales, células de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos, etc. De manera que, tales efectos probablemente dependen de las poblaciones celulares residentes dentro del órgano linfoide,

así como del microambiente circundante. La existencia de diferentes microambientes dentro de un mismo órgano linfoide puede influenciar en el efecto modulador de VIP. Éste varía dependiendo de la presencia de otras moléculas, de manera que VIP puede potenciar o inhibir los efectos de hormonas, neurotransmisores o citocinas. No obstante, a pesar de la controversia debida a la dualidad de efectos observados, la extensa modulación de la respuesta inmune ejercida por VIP convierte a este péptido en un potente inmunomodulador con gran potencial terapéutico.

4.2.1. Efectos de VIP sobre la producción de factores solubles

La comunicación entre la respuesta inmune innata y adquirida, así como el desarrollo de cada una de las respuestas está mediado en gran parte por la liberación de factores solubles, fundamentalmente citocinas, quimiocinas e inmunoglobulinas. Un gran número de investigaciones han mostrado que VIP es capaz de modular la producción de estos mediadores, regulando así numerosas funciones de ambos tipos de respuesta inmune.

Las **citocinas** son las principales moléculas solubles implicadas en el desarrollo de la respuesta inmune. Precisamente, uno de los primeros efectos descritos para VIP en el SI fue la modulación sobre la producción de citocinas. Fue en el año 1987 cuando Ottaway y sus colaboradores demostraron que VIP reducía la expresión de la IL-2 en linfocitos T activados (Ottaway, 1987). Posteriormente, un gran número de estudios han mostrado que uno de los principales mecanismos de acción a través de los cuales VIP regula la respuesta inmune es la modulación de la producción de diversas citocinas. Los efectos de VIP sobre la modulación son complejos, presentando efectos inhibidores y estimuladores para una misma citocina. No obstante, de forma general, la regulación ejercida por VIP consiste en la reducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IFN γ , IL-2, IL-6 e IL-12, a la vez que se estimula la producción de citocinas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-10 (De la Fuente *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 2000; Gomariz *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2004a; Gomariz *et al.*, 2006; Pozo *et al.*, 2007). Dado que VIP modula la producción de una gran variedad de citocinas secretadas por diferentes tipos de células inmunes, el péptido puede ejercer, al menos parcialmente, funciones inmunomoduladoras sobre múltiples aspectos inmunológicos, tales como la respuesta inflamatoria, la diferenciación linfoide, la expansión clonal, etc.

Paralelamente, también se ha descrito un efecto modulador de VIP sobre la producción de **inmunoglobulinas**. Los mecanismos de modulación de VIP sobre la producción de inmunoglobulinas son muy complejos y difieren en función del isotipo de inmunoglobulina estudiada, así como del origen de las células de estudio (Stanisz *et al.*, 1986) (véase *Tabla 7*). Además, los efectos pueden ser mediados de forma directa, a través del linfocito B, o indirecta, mediante el efecto sobre los linfocitos Th.

Tabla 6. Acciones biológicas de VIP sobre la producción de inmunoglobulinas.

Tipo celular del estudio	Efecto biológico	Especie del estudio	Referencias
Células B	+ IgG1 - IgG2a	Ratón	Delgado <i>et al.</i> 1999b.
Células mononucleares procedentes de nódulos linfáticos mesentéricos y de bazo.	+ IgA	Ratón	Stanisz <i>et al.</i> , 1986.
Células B procedentes de las Placas de Peyer.	- IgA + IgM	Ratón	Stanisz <i>et al.</i> , 1986.
Células mononucleares procedentes de la lámina propia intestinal.	+ IgA - IgG	Humano	Boirivant <i>et al.</i> , 1994.
Células mononucleares procedentes de amígdala de pacientes atópicos.	-IgE -IgG4	Humano	Kimata <i>et al.</i> , 1993
Linfocitos circulantes de pacientes con tumores pancreáticos endocrinos.	+ IgM	Humano	Annibale <i>et al.</i> , 1990.
Células B	+ IgA1 + IgA2	Humano	Kimata y Fujimoto, 1994.
Células B procedentes de la amígdala.	+ IgA	Humano	Fujieda <i>et al.</i> , 96; Ishioka <i>et al.</i> , 1992.
Células B procedentes de amígdala de pacientes atópicos.	-IgE	Humano	Kimata <i>et al.</i> , 1993.
Células B fetales.	+ IgA1 + IgA2 + IgM	Humano	Kimata y Fujimoto, 1995.
Línea celular linfoblastoide B, GM-1056.	+ IgA	Humano	Ishioka <i>et al.</i> , 1992; Kimata, 1996.
Línea celular linfoblastoide B, CBL.	+ IgM.	Humano	Ishioka <i>et al.</i> , 1992; Kimata, 1996.
Línea celular linfoblastoide B, IM-9.	+ IgG	Humano	Ishioka <i>et al.</i> , 1992; Kimata, 1996.
Línea celular B, SKW6.4.	- IgM	Humano	Cheng <i>et al.</i> , 1993.

Nota: Resumen de las principales acciones biológicas de VIP sobre las diferentes clases y subtipos de inmunoglobulinas.
Símbolos: + indica *Inducción* y - indica *Inhibición*.

Por su parte, las **quimiocinas** son moléculas quimioatrayentes que también participan activamente en el desarrollo de la respuesta inmune. Se ha descubierto que VIP modula la liberación de varias quimiocinas así como la señalización a través de sus receptores. Numerosas investigaciones han mostrado que VIP inhibe la expresión de quimiocinas como CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 (Delgado y Ganea, 2001b; Delgado y Ganea 2001c; Jiang *et al.*, 2002; Delgado y Ganea 2003a; Delgado y Ganea 2003b; Delgado *et al.*, 2004a; Abad *et al.*, 2005). Sin embargo, otros autores han observado un efecto estimulador para la expresión de CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL5 y CCL22 (Jiang *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004b; Kulka *et al.*, 2008). Gracias a estos efectos reguladores sobre la producción de diversas quimiocinas, VIP es capaz de modular la migración de diferentes tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, DCs, monocitos o linfocitos T, entre otros tipos celulares.

Finalmente, además de los mediadores de la respuesta inmune anteriormente citados, VIP es capaz de modular otros mediadores de la inflamación. Así, por ejemplo, se ha descrito que VIP regula la expresión de óxido nítrico sintasa inducible y la subsecuente liberación de óxido nítrico en macrófagos (Xin y Sriram, 1998; Delgado *et al.*, 1999c).

4.2.2. Efectos de VIP sobre la inmunidad innata

Como se menciona con anterioridad, los efectos de VIP sobre la inmunidad innata son numerosos y atañen a múltiples tipos celulares involucrados en el desarrollo de esta respuesta. En primer lugar, VIP presenta un efecto inhibitorio sobre la **activación de la inmunidad innata**. Esta respuesta inmune se desencadena tras la identificación de patógenos o daño tisular. El reconocimiento de los mismos tiene lugar a partir de PPR, tales como los TLR, tanto de superficie como intracelulares. Estos receptores actúan como sensores frente a la invasión de los patógenos y son esenciales para el inicio de la respuesta inmune (Takeda *et al.*, 2003). Se ha mostrado que VIP presenta un efecto inhibitorio sobre la expresión de receptores de esta familia como TLR-2, TLR-3, TLR-4 y TLR-7 en varios tipos celulares, obstaculizando así su habilidad para estimularse en respuesta al microambiente (Gomariz *et al.*, 2005; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007; Arranz *et al.*, 2008a; Arranz *et al.*, 2008b; Gomariz *et al.*, 2007; Gomariz *et al.*, 2010; Carrión *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012).

Junto con la activación celular, los fenómenos de **adherencia** y **quimiotaxis** son los primeros que tienen lugar y son claves en la organización de la respuesta inmune frente al patógeno o el daño tisular causante de la misma (Mackay e Imhof, 1993). Especialmente en los macrófagos, numerosas investigaciones han mostrado que VIP presenta efectos moduladores sobre ambos procesos. Las acciones descritas del péptido sobre la adherencia y la movilidad en los macrófagos son contradictorias. Algunos trabajos muestran que VIP estimula la adherencia y la migración de los macrófagos (De la Fuente *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 1998), mientras que otros autores han descrito un efecto contrario (Segura *et al.*, 1993; Litwin *et al.*, 1992). Las diferentes fuentes celulares, el diferente estado de activación celular y el diseño experimental pueden ser la causa de tales discrepancias. El denominador común de todos estos estudios indica que VIP presenta un efecto potenciador en células no estimuladas e inhibitorio en células pre-estimuladas.

Uno de los mecanismos de acción característicos de la respuesta inmune innata es la **fagocitosis**. Al igual que en el caso de la quimiotaxis de los macrófagos, se han mostrado efectos opuestos de VIP sobre estos procesos. Por un lado, se ha descrito un efecto estimulador sobre la fagocitosis (De la Fuente *et al.*, 1993), mientras por otro lado se ha encontrado un efecto inhibitorio sobre esta misma función (Litwin *et al.*, 1992; Ichinose *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 2001). Se cree que el estado de activación celular determina que el efecto de VIP sea estimulador o inhibitorio. Por otro lado, diferentes evidencias muestran también que VIP puede afectar, positiva o negativamente, a la producción de especies reactivas de oxígeno. Se ha descrito que VIP aumenta tal producción en macrófagos no

activados (De la Fuente *et al.*, 1993), mientras que la disminuye en monocitos, neutrófilos, células mononucleares, células de la línea monoblástica humana U937, eosinófilos y en macrófagos activados (Wiik, 1989; Wiik *et al.*, 1989; Wiik, 1990; Kurosawa e Ishizuka, 1993).

La **actividad lítica natural** es otro mecanismo de acción de la respuesta inmune innata. La función de las células NK es de gran importancia en la respuesta inmune dado que actúan protegiendo al huésped frente a tumores y virus (Herberman y Ortaldo, 1981). Estas células, además de los macrófagos, también son capaces de eliminar patógenos de forma inespecífica mediante procesos de lisis. En general, se ha descrito que VIP ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de las células NK (Rola-Pleszczynski *et al.*, 1985; Yiangou *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, en situaciones anómalas, se ha mostrado un efecto estimulador de VIP sobre la misma. Así, algunos estudios han descrito que VIP estimula la actividad NK deprimida por el virus de la hepatitis B o el virus del SIDA, o en la línea celular Caco-2 (van Tol *et al.*, 1991; Azzari *et al.*, 1992; Peruzzi *et al.*, 2000).

Por otro lado, además de los tipos celulares anteriormente descritos, VIP es capaz de modular las acciones de otras células pertenecientes a la inmunidad innata, tales como los mastocitos, los neutrófilos, los monocitos o las DCs. Así, por ejemplo VIP ejerce efectos moduladores sobre la liberación de histamina llevada a cabo por los mastocitos (Lowman *et al.*, 1988; Benyon *et al.*, 1989; Ottosson y Edvinsson, 1997; Tuncel *et al.*, 2000). Además, promueve la maduración de DCs (Delneste *et al.*, 1999). Estas y otras funciones hacen de VIP un neuropéptido inmunomodulador clave en la respuesta llevada a cabo por la inmunidad innata.

4.2.3. Efectos de VIP sobre la inmunidad adaptativa

Al igual que la modulación de la inmunidad innata, los efectos de VIP sobre la inmunidad adaptativa son muy amplios, afectando a numerosos procesos y tipos celulares.

En primer lugar, VIP es capaz de modular la activación linfoide mediante la regulación de los procesos de **co-estimulación**. La co-estimulación constituye un fenómeno clave en el proceso de activación linfocitaria. La molécula CD28, expresada constitutivamente en los linfocitos T, se une a los ligandos co-estimuladores B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), dando lugar así a la estimulación de los linfocitos. Se ha mostrado que VIP puede decrecer la actividad co-estimuladora de las APCs hacia las células T mediante la reducción de la expresión de dichas moléculas CD80 y CD86. Nuevamente, la expresión de B7 se ve afectada por VIP de manera opuesta dependiendo de si se trata de células activadas o no activadas. Se ha descrito que en macrófagos no activados la expresión de B7-2, pero no la expresión de B7-1, es aumentada, mientras que en macrófagos activados por LPS e IFN γ , VIP disminuye la expresión de ambas moléculas (Delgado *et al.*, 1999d). En DCs también se ha mostrado un efecto opuesto de VIP sobre la expresión de CD80 y CD86, dependiendo del estado de maduración o de activación (Delgado *et al.*, 2004c; Lu *et al.*, 2008b).

Una vez recibida la señal estimuladora y co-estimuladora y activado el linfocito T, la célula inicia el proceso de **proliferación** gracias a la liberación de IL-2. Al igual que en los casos anteriormente descritos, la respuesta proliferativa de los linfocitos T es modulada por VIP de forma diferente dependiendo del estado de activación de la célula y del diseño experimental, mostrándose efectos fundamentalmente inhibidores, pero también estimuladores. La primera evidencia acerca del efecto de VIP sobre la proliferación linfoide fue demostrada en 1984 por Ottaway y Greenberg en linfocitos murinos. En su trabajo, estos investigadores mostraron que VIP inhibía la respuesta proliferativa de las células T tras la estimulación mitogénica (Ottaway y Greenberg, 1984). Posteriormente, numerosos autores han investigado acerca de los efectos de VIP sobre la proliferación de timocitos y linfocitos T estimulados con mitógenos o con el antígeno, así como sobre la producción de IL-2 y su consecuente efecto sobre la proliferación (Stanisz *et al.*, 1986; Nordlind y Mutt, 1986a; Ottaway, 1987; Peuriere *et al.*, 1990; Yiangou *et al.*, 1990; Boudard y Bastide, 1991; Ganea y Sun, 1993; Sun y Ganea, 1993; Xin *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1996; Teresi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Trejter *et al.*, 2001; Pozo *et al.*, 2009). En referencia a los linfocitos B se han mostrado también efectos duales. Aunque se ha observado que VIP incrementa la proliferación en líneas humanas linfoblastoides B y en células B de la amígdala (Ishoka *et al.*, 1992), otros autores apuntan un efecto inhibidor (De la Fuente *et al.*, 1996).

Por otro lado, VIP también modula la **adherencia** y la **migración linfocitaria** (Gomariz *et al.*, 2001). La adhesión de los linfocitos al endotelio vascular es el paso inicial en la circulación de estas células hacia los sitios de inflamación. En relación con la adhesión linfocitaria, se ha mostrado un efecto inductor de VIP sobre la misma (De la fuente *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1994). Con respecto a los procesos migratorios, varios estudios muestran diferentes efectos del péptido sobre la migración linfoide. El primer experimento realizado en esta área mostró que VIP disminuía la salida de los linfocitos de los ganglios linfáticos de oveja (Moore, 1984). En la misma línea, se observó que VIP inhibía la movilidad de los linfocitos peritoneales, los timocitos y los esplenocitos de rata (De la fuente *et al.*, 1994; Delgado *et al.*, 1995). Sin embargo, otros estudios han mostrado la existencia de efectos tanto inductores como inhibidores para esta función. Así, por ejemplo, se ha descrito que VIP presenta un efecto dual sobre la migración de los leucocitos mononucleares (Bondesson *et al.*, 1991). Esta dualidad en el efecto de VIP sobre la migración linfoide es la que permite que el péptido pueda modular diferencialmente la distribución regional y tisular de las células T (Miura *et al.*, 1997). La diferencia de efecto entre unas células y otras puede estar relacionada con las diferentes subpoblaciones. Así, en el caso de los linfocitos Th, VIP estimula preferentemente la migración de los linfocitos Th2 (Delgado *et al.*, 2004b).

Finalmente, una vez desempeñada la respuesta inmune y eliminado el patógeno es importante que se produzca la **apoptosis** de las células inmunes que han llevado a cabo este proceso. La apoptosis es de especial importancia en los linfocitos, tanto en los procesos de selección intratímica, como en la eliminación de los mismos tras la eliminación del patógeno (Baumann *et al.*, 2002). Un gran número de evidencias han demostrado que una de las principales funciones fisiológicas de VIP es actuar como

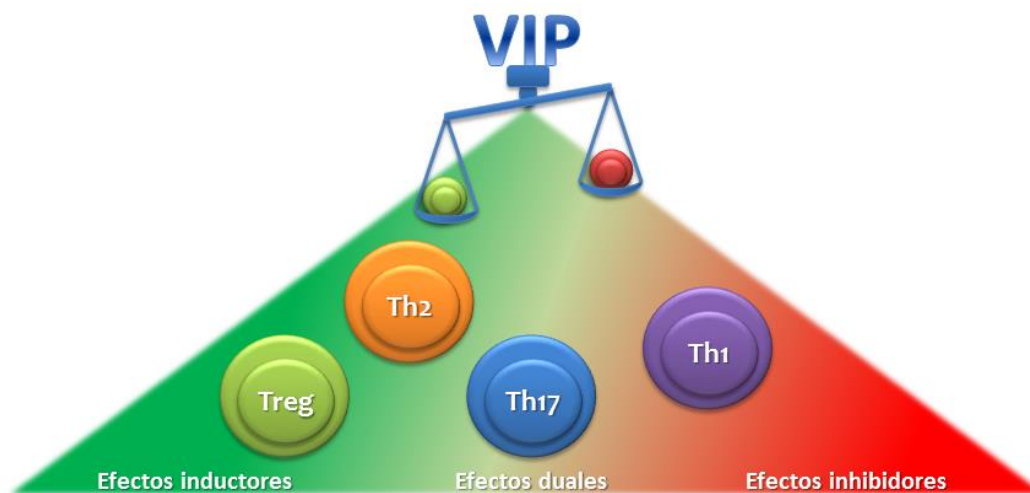
factor de supervivencia. En los años 1995 y 1996, gracias a los trabajos de los grupos de investigación de la Dra. Gomariz y el Dr. Mutt, fue sugerida por primera vez la posibilidad de que la inhibición de la apoptosis fuese el principal mecanismo mediante el cual VIP ejerce su función citoprotectora en el SI, mostrándose que VIP protegía a los timocitos frente a la apoptosis (Ernström *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1996b). Posteriormente, se ha observado la acción inhibidora de VIP sobre la apoptosis de linfocitos T CD4 y concretamente también sobre linfocitos Th2, mediante la inhibición de la expresión de FasL y granzima B (GZMB) (Delgado y Ganea, 2000a; Delgado *et al.*, 2002c; Sharma *et al.*, 2006). Así mismo, se ha mostrado que VIP modula también la expresión de FasL en linfocitos T CD8 (Delgado y Ganea, 2000b).

4.2.4. Efectos biológicos de VIP sobre los linfocitos T colaboradores

Uno de los múltiples efectos biológicos de VIP sobre el SI es la modulación de las funciones de los linfocitos T colaboradores. Se ha mostrado que VIP es capaz de regular las respuestas de los distintos subtipos de células Th: Th1, Th2, Th17 e iTreg (véase *Figura 23*). Dicha modulación sobre los linfocitos Th es selectiva, es decir, sus efectos pueden ser inhibidores o estimuladores en función de la subpoblación sobre la que se ejerzan. De modo general, los diversos estudios desarrollados tanto *in vitro* como *in vivo*, han mostrado que VIP decrece las respuestas de tipo Th1, incrementa las respuestas asociadas a Th2, regula la diferenciación y función de las células Th17 y promueve las funciones T reguladoras.

En términos de la modulación de VIP sobre las respuestas Th, la más ampliamente estudiada es la regulación de los subtipos **Th1** y **Th2**. Mediante diferentes aproximaciones experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo* se ha mostrado que VIP modula la diferenciación linfoide favoreciendo la diferenciación hacia un patrón de tipo Th2 e inhibiendo la diferenciación hacia el subtipo Th1. Concretamente, se ha descrito que el tratamiento *in vitro* de macrófagos con VIP aumenta su capacidad de inducción de la diferenciación de células T CD4 activadas hacia el fenotipo Th2 y de inhibición de la diferenciación hacia el fenotipo Th1 (Delgado *et al.*, 1999b). Así mismo, experimentos realizados *in vivo* en ratón han corroborado estos resultados al encontrarse una reducción del número de células productoras de IFN γ y un aumento del número de células secretoras de IL-4 (Delgado *et al.*, 1999b). En la misma línea, en ratones se ha mostrado que VIP estimula la producción de inmunoglobulinas de isotipo IgG1, asociada al fenotipo Th2, y disminuye la producción de IgG2a, asociada al fenotipo Th1 (Delgado *et al.*, 1999b). También, se ha observado el reajuste del balance Th1/Th2 por parte de VIP en ratones transgénicos para el receptor VPAC₂ (Voice *et al.*, 2003).

Figura 23. Acciones biológicas de VIP sobre las células Th.



Nota: Representación esquemática de la acción de VIP sobre las células T colaboradoras, así como sobre los balances entre unas y otras subpoblaciones Th.

Aunque los mecanismos precisos aún no se han dilucidado, VIP regula el equilibrio entre las subpoblaciones Th1 y Th2 (Th1/Th2) a través de diferentes mecanismos no excluyentes, algunos de los cuales se han comentado en apartados anteriores debido a la estrecha relación entre la inmunidad innata y adquirida. En primer lugar, VIP inhibe la producción de IL-12, citocina implicada en la diferenciación de Th1 (Delgado y Ganea 1999; Delgado *et al.*, 1999e). En segundo lugar, VIP induce la expresión de CD86 en macrófagos y DCs, lo cual es importante para el desarrollo de las células Th2 (Delgado *et al.*, 1999b; Delgado *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2004c). En tercer lugar, VIP induce la expresión de los factores de transcripción c-Maf y JunB, necesarios para la diferenciación de células Th2 (Voice *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que VIP promueve el reclutamiento específico de células Th2 mediante la inhibición de la producción de la quimiocina CXCL10 y la inducción de la producción de CCL22, dos quimiocinas que están involucrados en la migración de las células Th1 y Th2, respectivamente (Delgado *et al.*, 2004b; Jiang *et al.*, 2002). Además, VIP promueve la generación y supervivencia selectiva de células Th2 frente a células Th1 (Delgado y Ganea, 2001d; Delgado *et al.*, 2002c). De tal manera que VIP regula el equilibrio Th1/Th2, actuando tanto de forma directa sobre la diferenciación de las células Th, como indirectamente a través de la regulación de las funciones de las APCs.

Por otro lado, las investigaciones de los últimos años han descrito también la capacidad de VIP para regular la generación de células **Th17**, así como la producción de IL-17. Sin embargo, dada la relativa novedad en el descubrimiento de estas células, los trabajos acerca del estudio de las acciones de VIP sobre los linfocitos Th17 son escasos y se han realizado fundamentalmente sobre células Th17 murinas. *In vitro*, se ha mostrado un incremento en el número de células T CD4 productoras de IL-17 asociado a la presencia de VIP (Yadav y Goetzl, 2008; Yadav *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2012).

Finalmente, también se ha descrito la modulación por parte de VIP sobre las células **Treg**. La regulación de VIP sobre la respuesta de estas células se produce mediante mecanismos directos e

indirectos. Por un lado, VIP es capaz de inducir directamente respuestas reguladoras en linfocitos Th (Delgado *et al.*, 2005a; Pozo *et al.*, 2009; Andersson y Gonzalez-Rey, 2010). Por otro lado, VIP induce de forma indirecta, la generación de células Treg a través de la inducción de DCs tolerogénicas (Chorny *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2005b; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006a).

5. RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE VIP

Se han descrito tres receptores para VIP, denominados VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁ teniendo en cuenta la nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (Harmar *et al.*, 1998; Harmar *et al.*, 2012). Fundamentalmente VIP, ejerce sus múltiples funciones biológicas a través de los receptores VPAC₁ y VPAC₂, los cuales presentan una alta afinidad para el péptido, y se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso, endocrino e inmune. Los receptores de VIP pertenecen a una subfamilia de GPCRs denominada familia de clase II, familia B o familia de tipo secretina (Laburthe *et al.*, 1996; Couvineau y Laburthe, 2012). Esta subfamilia de GPCRs comprende varios miembros, incluyendo receptores para VIP, PACAP, secretina, glucagón, GLP-1, GLP-2, GRF y GPI, así como receptores para péptidos pertenecientes a otras familias como calcitonina, hormona paratiroidea y CRF, entre otros (Laburthe *et al.*, 1996; Couvineau *et al.*, 2012). Así mismo, la subfamilia de clase B se subdivide en receptores de clase B1, B2 y B3 (Harmar, 2001). Los receptores para VIP se encuentran clasificados en la clase B1, juntos con los receptores para GLP1, GLP2, PACAP y GRF (Harmar, 2001). Los receptores pertenecientes a la subfamilia B comparten con otros receptores de tipo GPCR la misma estructura general (Laburthe *et al.*, 2002; Couvineau *et al.*, 2012). Constan de un dominio amino terminal, siete dominios o hélices transmembranales, interconectados mediante tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares, y un dominio citoplasmático (Laburthe *et al.*, 1996; Couvineau *et al.*, 2012). Los receptores pertenecientes a esta clase presentan en su secuencia aminoacídica 83 residuos, localizados principalmente en el dominio amino terminal, los dominios transmembranales y el primer bucle intracelular, que se encuentran estrictamente conservados en todos ellos. A pesar de la elevada homología en la estructura entre los distintos receptores, el dominio N-terminal posee múltiples sitios de N-glicosilación, la cual tiene lugar de forma diferencial dependiendo del tejido y de la especie. Además, el dominio carboxilo terminal presenta una elevada variabilidad en su estructura primaria. Generalmente, las variantes que difieren en la secuencia aminoacídica en el extremo N-terminal o en los bucles extracelulares presentan modificaciones en la afinidad y selectividad al ligando, mientras que las variaciones en los bucles intracelulares o en el extremo C-terminal pueden influir en la diferente activación de las vías de transducción de señales al interior celular (Furness *et al.*, 2012).

Los receptores de tipo GPCR señalizan fundamentalmente a través de su interacción a proteínas G, lo que se denomina vía canónica (Johnston y Siderovski, 2007; Langer, 2012). Sin embargo, también pueden interaccionar con otras proteínas que se han denominado proteínas de interacción con GPCRs (GIPs, del inglés *GPCR Interacting Proteins*) (Bockaert *et al.*, 2004). La señalización a través de GIPs es lo que se denomina vía no canónica (Boullaran y Kherl, 2014). La naturaleza de estas proteínas es diversa,

de tal modo que los GPCRs pueden unirse a proteínas de varias familias (Brady *et al.*, 2002), tales como proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMPs, del inglés *Receptor Activity-Modifying Proteins*) (Christopoulos *et al.*, 2003) o factores de ribosilación ADP (ARFs, del inglés *ADP-Ribosylation Factors*) (Mcculloch *et al.*, 2001). Esta interacción con diferentes proteínas puede modular la actividad del receptor, así como modificar sus características farmacológicas.

5.1. VPAC₁

El receptor VPAC₁ fue aislado por primera vez a partir de pulmón de rata (Ishihara *et al.*, 1992). En humanos el receptor une con la misma afinidad VIP y PACAP, sin embargo presenta menos afinidad para otros péptidos de la familia como PHI, GRF y secretina (Couvineau *et al.*, 1996a).

En cuanto a la distribución general de VPAC₁, el ARNm que codifica para este receptor se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, localizándose abundantemente en el córtex cerebral y en el hipocampo (Ishihara *et al.*, 1992; Usdin *et al.*, 1994). Además del SNC, el receptor se expresa en numerosos tejidos periféricos como pulmón, corazón, estómago, intestino grueso y delgado, hígado, páncreas, tiroides, glándula adrenal, riñón, mama, ovario, útero, vesícula seminal y próstata (Christophe *et al.*, 1981; Prieto *et al.*, 1981; Magistretti *et al.*, 1988; Molinero *et al.*, 1985; Guijarro *et al.*, 1991; Shivers *et al.*, 1991; Ishihara *et al.*, 1992; Rodriguez-Henche *et al.*, 1994; Usdin *et al.*, 1994; Sreedharan *et al.*, 1995; Borboni *et al.*, 1999; Juarranz *et al.*, 1999a; Bajo *et al.*, 2000; Garcia-Fernandez *et al.*, 2005).

El gen que codifica para el receptor VPAC₁ humano se encuentra localizado en la región el p21.33-31 del cromosoma 3 y consta de 22Kb distribuidas en trece exones y doce intrones (Sreedharan *et al.*, 1995). En relación a su región promotora, este gen presenta una caja TATA, una caja CCAAT y una región rica en GC, que son cruciales para la activación de su transcripción (Sreedharan *et al.*, 1995; Couvineau *et al.*, 2000). Además, presenta una secuencia TGGGAT que constituye un sitio de unión a la factor de transcripción denominado IKAROS, el cual es responsable de la represión de la transcripción del gen (Dorsam y Goetzl, 2002). A nivel transcripcional la expresión de VPAC₁ puede ser regulada a través de diferentes moléculas entre las que se encuentran hormonas como glucocorticoides o estradiol (Pei, 1996; Madsen *et al.*, 2001).

En referencia a la estructura tridimensional del receptor VPAC₁, como miembro de la clase B de GPCRs, presenta un dominio amino extracelular es un dominio largo, que cuenta con más de 120 residuos. Esta región amino terminal extracelular es donde reside fundamentalmente la selectividad para el ligando VIP (Holtmann *et al.*, 1995; Juarranz *et al.*, 1999b; Du *et al.*, 2002; Ceraudo *et al.*, 2012; Couvineau *et al.*, 2012). Contiene seis cisteínas altamente conservadas que establecen tres puentes disulfuro y consta de dos láminas β anti-paralelas, estabilizadas por los tres puentes disulfuro y por un puente salino formado por los anillos aromáticos de dos residuos de Trp. Numerosos aminoácidos distintos pertenecientes a este dominio han sido implicados en esta unión al ligando, los cuales varían en función del estudio realizado. Sin embargo, además del dominio amino terminal, otros dominios

están implicados en la interacción con el ligando. Así, aminoácidos de los bucles extracelulares 1 y 2, y aminoácidos de los dominios transmembranales 1 y 2, entre otros, son también necesarios para la interacción con VIP (Juarranz *et al.*, 1999b; Du *et al.*, 1997; Knudsen *et al.*, 1997; Ceraudo *et al.*, 2012). Por otro lado, además de la interacción con el ligando, existen otras regiones implicadas en diversas funciones del receptor. Por ejemplo, en relación a la actividad del receptor, se han identificado diversas regiones implicadas, tales como un motivo estructural común en todos los receptores de clase B denominado N-cap (Neumann *et al.*, 2008). De tal manera que los numerosos estudios de clonación, mutagénesis dirigida y quimeras moleculares han permitido identificar regiones implicadas en la afinidad del receptor al péptido (Couvineau *et al.*, 1995; Holtmann *et al.*, 1995; Juarranz *et al.*, 1999b; Ceraudo *et al.*, 2012), en la especificidad (Couvineau *et al.*, 1996a; Du *et al.*, 2002), en el acoplamiento del receptor a la membrana plasmática (Couvineau *et al.*, 1996b), en la desensibilización del receptor (Marie *et al.*, 2003), en la asociación del receptor a proteínas RAMP (Christopoulos *et al.*, 2003; Wootten *et al.*, 2013), en la activación de la adenilato ciclasa (AC) (Couvineau *et al.*, 2003) y en la transducción de señales a través de calcio (Langer *et al.*, 2002).

La localización preferente del receptor VPAC₁ es la membrana plasmática celular, sin embargo, también se ha descrito su localización nuclear en células mamarias y renales (Valdehita *et al.*, 2010; Vacas *et al.*, 2012).

5.2. VPAC₂

El receptor VPAC₂ fue clonado inicialmente en el bulbo olfatorio de rata (Lutz *et al.*, 1993). Reconoce VIP con una ligera menor afinidad que VPAC₁ pero, al igual que éste, reconoce VIP y PACAP con la misma afinidad. También reconoce otros péptidos de la familia como PHI y GRF, sin embargo no reconoce el péptido secretina (Usdin *et al.*, 1994).

El receptor VPAC₂, del mismo modo que VPAC₁, se encuentra distribuido en el SNC. Sin embargo, su localización es aparentemente complementaria a la de éste, localizándose en zonas opuestas. Su presencia se ha descrito principalmente en tálamo y núcleo supraquiasmático, aunque también presenta bajos niveles de expresión en hipocampo, tronco encefálico, espina dorsal y ganglios raquídeos dorsales (Usdin *et al.*, 1994; Sheward *et al.*, 1995). En cuanto a su expresión en tejidos periféricos, se ha detectado VPAC₂ en pulmón, corazón, músculo liso, estómago, páncreas, riñón, tejido adiposo, ovario, útero, testículo y pene (Usdin *et al.*, 1994; Adamou *et al.*, 1995; Busto *et al.*, 1999; Bajo *et al.*, 2000; Groneberg *et al.*, 2001b; Guidone *et al.*, 2002; Harmar *et al.*, 2004).

El gen que codifica para el receptor VPAC₂ humano se localiza en el cromosoma 7 en la región q36.3 y está formado por 117kb repartidas en trece exones (Mackay *et al.*, 1996; Lutz *et al.*, 1999a). Presenta secuencias ricas en GC, varios sitios Sp1 y secuencias afines a factores de transcripción de la familia GATA, pero no presenta caja TATA ni secuencia CCAAT (Lutz *et al.*, 1999a). A pesar de estas diferencias, su homología con el gen que codifica para VPAC₁ es tal que se considera la existencia de

un gen ancestral común para ambos receptores. A nivel transcripcional la expresión de este receptor es regulada por citocinas, como la IL-4 (Metwali *et al.*, 2000).

En relación a su estructura tridimensional, ésta se halla mucho menos estudiada que la del receptor VPAC₁. Se considera que el dominio amino terminal, al igual que en el caso de VPAC₁, es crucial para la interacción con el ligando VIP (Nicole *et al.*, 1998), aunque también otros dominios están involucrados (Juarranz *et al.*, 1999b; Juarranz *et al.*, 1999c; Vertongen *et al.*, 2001; Nachtergaeel *et al.*, 2003).

5.3. PAC₁

El receptor PAC₁ fue clonado por primera vez en una línea celular procedente de un carcinoma pancreático acinar de rata (Pisegna y Wank, 1993). Se trata de un receptor de elevada afinidad por el péptido PACAP, que presenta muy baja afinidad para VIP (aproximadamente unas quinientas veces menor) y aún menor para GRF (Cauvin *et al.*, 1991).

Comparado con los receptores VPAC₁ y VPAC₂, PAC₁ se localiza de forma mayoritaria en el SNC (Basille *et al.*, 2000). Está especialmente expresado en el bulbo olfatorio, el tálamo, el giro dentado del hipocampo, el núcleo supraóptico del hipotálamo y el córtex cerebelar (Gottschall *et al.*, 199; Hashimoto *et al.*, 1996; Nomura *et al.*, 1996; Shioda *et al.*, 1996a; Otto *et al.*, 1999). En los tejidos periféricos, PAC₁ se expresa fundamentalmente en la glándula adrenal (Shivers *et al.*, 1991; Moller *et al.*, 1996), pero también se expresa en pulmón, ojo, hígado, páncreas, ovario, testículo, pene e hiperplasia de próstata (Shivers *et al.*, 1991; Hosoya *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1994; Usdin *et al.*, 1994; Carmena *et al.*, 1996; Scaldaferrri *et al.*, 1996; Shioda *et al.*, 1996b; Busto *et al.*, 1999; Guidone *et al.*, 2002).

El gen que codifica para el receptor PAC₁ humano se localiza en el cromosoma 7 en la región p15-14 y presenta 15 exones 14 intrones (Brabet *et al.*, 1996). Al contrario que los receptores VPAC₁ y VPAC₂ donde la existencia de variantes alternativas no está clara (Dickson y Finlayson, 2009), está bien establecido que este receptor presenta variantes generadas por procesamiento alternativo. Las variantes varían principalmente en función de la presencia o ausencia de determinadas secuencias proteicas en el tercer bucle intracelular, en la aparición de determinadas deleciones en el dominio amino terminal o incluso en la presencia de determinadas inserciones (Journot *et al.*, 1995; Pantaloni *et al.*, 1996; Dautzenberg *et al.*, 1999; Daniel *et al.*, 2001). En humanos una de estas variantes, que se denomina "PAC₁-short" presenta igual afinidad por VIP que por PACAP (Dautzenberg *et al.*, 1999). En cuanto a la estructura del promotor, este receptor tampoco contiene caja TATA en su promotor, aunque si muestra una caja CCAAT y dos sitios Sp1 (Aino *et al.*, 1995).

En relación a la estructura tridimensional del receptor PAC₁, al igual que en el caso de los receptores VPAC₁ y VPAC₂, parece ser que el dominio amino terminal es imprescindible para la unión a su ligando (Cao *et al.*, 1995). Este mismo dominio, así como los dominios transmembranales 1 y 2 y el

primer bucle extracelular del receptor, son los que determinan la baja afinidad por el péptido VIP (Hashimoto *et al.*, 1997, Lutz *et al.*, 1999b).

5.4. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE VIP

El desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos para los receptores de VIP constituye en la actualidad un área de investigación intensa, cuyos resultados han sido cruciales para establecer secuencias aminoacídicas implicadas en el reconocimiento de ligando, para determinar la conformación espacial de los receptores, así como para estudiar de forma selectiva las funciones de VIP a través de cada uno de ellos. En relación con los dos principales receptores de VIP, fundamentalmente existen tres tipos de agonistas, incluyendo agonistas de VPAC₁, agonistas de VPAC₂ y agonistas no selectivos. Numerosas investigaciones han dado lugar a múltiples agonistas con diferentes características y afinidad (Véase *Tabla 7*). Los agonistas más específicos y más empleados para el receptor VPAC₁ humano se denominan [Ala^{11,22,28}]VIP y [K¹⁵, R¹⁶, L²⁷] VIP (1-7)/GRH (8-27) (Gourlet *et al.*, 1997b; Nicole *et al.*, 2000). Por otra parte, los llamados Ro 25-1392 y Ro 25-1553 son los más específicos para VPAC₂ (Bolin *et al.*, 1995a; Gourlet *et al.*, 1997c; Xia *et al.*, 1997), mientras que el agonista más selectivo para PAC₁ es Maxadilan (Moro *et al.*, 1997). Con respecto a los antagonistas, PG 97-269 es el antagonista selectivo de VPAC₁ (Gourlet *et al.*, 1997d). Sin embargo, para VPAC₂, aún no se ha encontrado ningún antagonista que sea altamente selectivo para dicho receptor. Los antagonistas Max.d.4 y M65 son selectivos para PAC₁ (Uchida *et al.*, 1998; Tatsuno *et al.*, 2001). Otros muchos agonistas y antagonistas se han definido, pero todos presentan restricciones en cuanto a su afinidad y/o selectividad.

Tabla 7. Agonistas y antagonistas de los receptores de VIP.

	VPAC1	VPAC2	PAC1
Agonista	[Ala ^{11,22,28}] VIP (Nicole <i>et al.</i> , 2000)	Ro 25-1392 (Xia <i>et al.</i> , 1997)	Maxidilan (Moro <i>et al.</i> , 1997)
	[K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ²⁷] VIP (1-7)/ GRH (8-27) (Gourlet <i>et al.</i> , 1997b)	Ro 25-1553 (Bolin <i>et al.</i> , 1995a; Gourlet <i>et al.</i> , 1997c)	
	(Ala ^{2,8,9,11,19,24-28})VIP (Igarashi <i>et al.</i> , 2005)	rRBAYL (Ma <i>et al.</i> , 2010)	
	(Ala ^{2,8,9,11,19,22,24,25,27,28})VIP (Igarashi <i>et al.</i> , 2005)	Moléculas creadas por mutagénesis de los péptido VIP y PACAP (Yung <i>et al.</i> , 2003)	
	[Tyr ⁹ ,Dip ¹⁸] VIP (1-28) (Tams <i>et al.</i> , 2000)	Péptidos recombinantes: rMROM (Yu <i>et al.</i> , 2006) rMBAY (Yu <i>et al.</i> , 2007b)	
	[Ala ²²] VIP (Gourlet <i>et al.</i> , 1998)	BAY 55-9837 (Tsutsumi <i>et al.</i> , 2002)	
	VIP ₄₋₂₈ (Summers <i>et al.</i> , 2003a)		
Antagonista	PG 97-269 o [Ac-His ¹ , D-Phe ² , K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ²⁷] VIP (3-7)/ GRH (8-27) (Gourlet <i>et al.</i> , 1997d)	PG 99-465 (Moreno <i>et al.</i> , 2000)	Max.d.4 (Tatsuno <i>et al.</i> , 2001)
	[Tyr ⁹ ,Dip ¹⁸] VIP (6-23) (Tams <i>et al.</i> , 2000)	Componente 1 (Chu <i>et al.</i> , 2010)	M65 (Uchida <i>et al.</i> , 1998)
	Fragmentos de VIP: VIP(10-28) (Turner <i>et al.</i> , 1986) VIP(1-11) (Goossens <i>et al.</i> , 1992)	PACAP-(6-38) (Tornøe <i>et al.</i> , 1997)	
	(N-Ac-Tyr ¹ ,D-Phe ²)-GRH (1-29)-NH ₂ (Waelbroeck <i>et al.</i> , 1985)	VIP ₄₋₂₈ (Summers <i>et al.</i> , 2003a)	
	[4-Cl-D-Phe ⁶ -Leu ¹⁷] VIP (Pandol <i>et al.</i> , 1986)		
	JV-1-50, JV-1-51, JV-1-52 y JV-1-53 (Rekasi <i>et al.</i> , 2000)		
	VIPhyb (Li <i>et al.</i> , 2013b)		

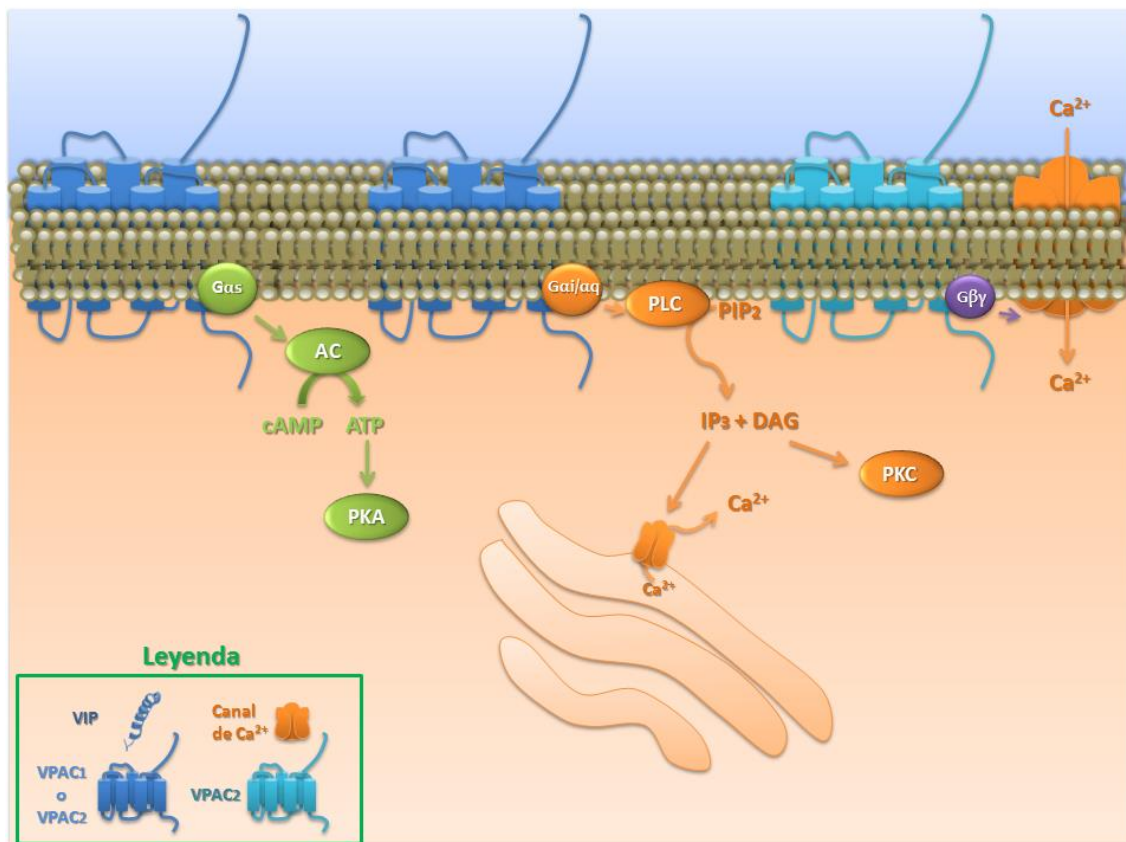
Nota: Resumen de los principales agonistas y antagonistas desarrollados para los receptores VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁.

5.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE VIP

Los receptores VPAC₁ y VPAC₂, como miembros de la familia de GPCRs señalizan fundamentalmente a través de su unión a proteínas G (vía canónica) (véase *Figura 24*). La activación de los receptores se produce mediante el cambio conformacional que induce el ligando en ellos, el cual permite la interacción del receptor con las proteínas G. Esta interacción permite la activación de la proteína G y la subsecuente disociación de la subunidad α . Generalmente, la activación del receptor da lugar, a través de la proteína Gas, a la estimulación de la AC, con la consecuente producción de

AMPC y activación de la vía de la PKA (Laburthe *et al.*, 1978; Laburthe *et al.*, 1979a; Laburthe *et al.*, 1979b; Couvineau *et al.*, 1990; Kermode *et al.*, 1992; Shreeve *et al.*, 2000). No obstante, los receptores de VIP señalizan también a través de la activación de la PLC, la cual es activada por proteínas G de tipo Gαq o Gαi y da lugar a la activación de la vía de inosítoles fosfato/calcio lo que resulta en el incremento de la concentración de calcio intracelular y a la estimulación de la vía de señalización de la PKC (Van Rangelbergh *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1999; Shreeve *et al.*, 2000; Mackenzie *et al.*, 2001). Además de la señalización promovida por la subunidad Gα, se ha descrito que el receptor VPAC₂ es capaz de activar canales de calcio extracelulares, a través de la subunidad βγ de la proteína G (McKenzie *et al.*, 2001).

Figura 24. Vías de señalización del péptido VIP.



Nota: Representación esquemática de las vías de señalización canónicas activadas por VIP a través de sus receptores VPAC₁ e VPAC₂.

La propiedad de los receptores VPAC₁ y VPAC₂ de unirse a otras proteínas, además de proteínas G, les confiere la posibilidad de activar otras vías de señalización, descritas como no canónicas (véase Tabla 8). Así por ejemplo, el receptor VPAC₁ puede interaccionar con la proteína RAMP2, que induce la producción de inositol trifosfato y el subsecuente efecto sobre los niveles de calcio intracelulares (Christopoulos *et al.*, 2003). Por su parte, el receptor VPAC₂, por ejemplo, puede unirse a ARF lo que da lugar a la activación de la fosfolipasa D (PLD, del inglés *PhosphoLipase D*) que conduce a la liberación de los mediadores ácido fosfatídico y colina (McCulloch *et al.*, 2000, McCulloch *et al.*, 2001).

Tabla 8. Vías de señalización no canónicas de los receptores VPAC₁ y VPAC₂.

GIP	Receptor	Alteración afinidad	Señalización	Referencias bibliográficas
RAMP1,2,3	VPAC ₁	No	✓ Aumento o no de la actividad de Gαq ✓ Aumento de la actividad de PLC	Christopoulos <i>et al.</i> , 2003 Couvineau y Laburthe, 2012
RAMP1,2,3	VPAC ₂	No	✓ No cambios en Gαs ✓ Aumento en la actividad de Gαi	Wooten <i>et al.</i> , 2013
ARF	VPAC ₂	¿?	Activación de la PLD	Mcculloch <i>et al.</i> , 2000 Mcculloch <i>et al.</i> , 2001
Calmodulina	VPAC ₁	¿?	¿?	Couvineau y Laburthe, 2012
S-SCAM/MAG1-2	VPAC ₁	¿?	✓ Inhibición de la producción de AMPc ✓ Internalización del receptor	Couvineau y Laburthe, 2012

Nota: Resumen de las principales vías de señalización no canónicas de los receptores de VIP. La tercera columna indica si la unión de la proteína al receptor causa una alteración en la afinidad del receptor por su ligando. La cuarta columna muestra las principales características de la señalización activada.

En relación a las vías de transducción de señales desencadenados por el receptor PAC₁, fundamentalmente este receptor señala a través de las enzimas AC y PLC (Pisegna *et al.*, 2000). Sin embargo, los mecanismos varían en función de la variante del receptor de que se trate pudiendo activarse también PLD y otras vías de señalización (Vaudry *et al.*, 2009).

Además de las vías de señalización descritas, los receptores de VIP también pueden modular positiva o negativamente otras vías independientes de AMPc que implican tirosin cinasas (Morisset *et al.*, 1995), NFκB (Said y Dickman, 2000), PI3K (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2005), GMPc (Spessert, 1993), canales de calcio (Chatterjee *et al.*, 1996, Tompkins *et al.*, 2006), GTPasas de tipo RhoA (Henle *et al.*, 2006), MAPK (Moroo *et al.*, 1998), hemo oxigenasas (Watkins *et al.*, 2004), entre otras vías.

Los receptores de VIP, al igual que otros GPCRs son capaces de dimerizar formando homodímeros o heterodímeros (Couvineau *et al.*, 2012; Langer, 2012). Los heterodímeros pueden constituirlos entre sí (VPAC₁/VPAC₂), con otros receptores de la familia, como por ejemplo con secretina, o con proteínas transmembranales como RAMPs. La formación de dímeros entre los propios receptores VPAC₁ y VPAC₂ no modifica la afinidad natural ni al ligando natural ni a agonistas específicos, mientras que la unión al receptor de secretina causa la internalización del receptor (Harikumar *et al.*, 2006).

En suma, la señalización de VIP al interior celular incluye una gran variedad de vías, involucrando múltiples segundos mensajeros. La activación de unos u otros depende de los receptores, las proteínas G, así como del repertorio de moléculas accesorias disponibles. De tal modo

que, la principal vía de señalización activada en una determinada célula dependerá fundamentalmente del subtipo de receptor expresado predominantemente y del nivel de activación y/o diferenciación celular (Onoue *et al.*, 2008).

5.6. RECEPTORES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE VIP EN EL SISTEMA INMUNE

En el SI se ha mostrado también la expresión de los tres receptores de VIP: VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁. En un principio se describieron de forma indeterminada lugares de unión para VIP en una amplia variedad de células inmunes y líneas celulares linfocíticas de diversas especies (Beed *et al.*, 1983; Danek *et al.*, 1983; Ottaway *et al.*, 1983; Ottaway *et al.*, 1984; Calvo *et al.*, 1986; Finch *et al.*, 1989; O'Dorisio *et al.*, 1989; Ottaway *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1993). Estos estudios indicaron la existencia de lugares de unión de una clase de receptores de alta afinidad o de dos clases, una de baja y otra de alta afinidad, dependiendo del tipo celular y del estado de activación celular. Sin embargo, la confirmación de la expresión de receptores funcionales para VIP tuvo lugar en linfocitos humanos de sangre periférica (Guerrero *et al.*, 1981, O'Dorisio *et al.*, 1981). Tras la clonación de los receptores, los estudios se focalizaron en la expresión de los tres tipos de receptores. Se ha mostrado que VPAC₁ se expresa en linfocitos (Ottaway y Greenberg, 1984; Gomariz *et al.*, 1994b), timocitos simples positivos, dobles positivos y dobles negativos (Delgado *et al.*, 1996c; Johnson *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 1997), monocitos (Wiik *et al.*, 1985) y macrófagos (Segura *et al.*, 1991; Calvo *et al.*, 1994a; Calvo *et al.*, 1994b; Sakakibara *et al.*, 1994; Delgado *et al.*, 1996a). En cuanto a las subpoblaciones linfoides, se ha encontrado expresión de VPAC₁ tanto en linfocitos T como en linfocitos B (Gomariz *et al.*, 1994b; Qian *et al.*, 2001). La expresión de VPAC₁ en los diferentes tipos celulares descritos anteriormente es constitutiva, sin embargo se ha descrito que existe una regulación negativa de la misma tras la activación celular en linfocitos T CD4 y CD8 (Lara-Marquez *et al.*, 2001; Vomhof-DeKrey *et al.*, 2008; Vomhof-DeKrey *et al.*, 2011). A diferencia del receptor VPAC₁ que se expresa de forma constitutiva, la expresión del receptor VPAC₂ es inducible. Su expresión en células naïve o en reposo es muy baja y es la activación con anticuerpo anti-CD3 o con LPS de linfocitos y macrófagos respectivamente, lo que da lugar a la expresión del receptor (Delgado *et al.*, 1996a; Delgado *et al.*, 1996c). Sin embargo, también se ha detectado expresión constitutiva de este receptor en timocitos dobles y simples positivos CD4 y CD8 (Xin *et al.*, 1997; Pankhaniya *et al.*, 1998). Por su parte, el receptor PAC₁ se expresa únicamente en monocitos y macrófagos, y no así en linfocitos (Pozo *et al.*, 1997).

El amplio espectro de mediadores inflamatorios modulado por VIP se explica gracias a que el péptido es capaz de regular varias vías de transducción de señales y factores de transcripción esenciales para la activación transcripcional de la mayoría de los factores inflamatorios, tales como NFκB, IRF-1, MAPK y CREB. También en el SI, VIP señala fundamentalmente a través de la activación de la AC y la producción del AMPc (O'Dorisio *et al.*, 1981, Segura *et al.*, 1992). Esta vía, denominada **vía dependiente de PKA**, es la responsable de la mayoría de los efectos anti-inflamatorios de VIP en macrófagos, monocitos y DCs, y de la regulación de la respuesta de los linfocitos T. Fundamentalmente, a través de esta vía se incrementa la producción de citocinas anti-

inflamatorias y se reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias. Se sabe que el incremento de los niveles de AMPc da lugar a la inhibición de una amplia variedad de funciones en diversas células involucradas en la respuesta inmune (Bourne *et al.*, 1974). Por ejemplo, el AMPc inhibe la quimiotaxis linfoide (Moore y Lachmann, 1982) y la actividad citotóxica de linfocitos y células NK (Henney *et al.*, 1972; Roder y Klein, 1979). Por ello, la acción inhibidora de VIP sobre muchas funciones inmunes se ha atribuido a su capacidad para incrementar los niveles de AMPc. Así, se ha mostrado por ejemplo que la inhibición de la quimiotaxis linfoide inducida por VIP está mediada por el aumento de la concentración de AMPc intracelular (Moore, 1984; De La Fuente *et al.*, 1994; Delgado *et al.*, 1995). Del mismo modo, se ha sugerido que la elevación de los niveles de AMPc es la causa de la acción inhibidora de VIP sobre las células NK (Rola-Pleszczynski *et al.*, 1985). En relación a los mecanismos de señalización desencadenados por VIP a través de la vía del AMPc existen diferentes factores de transcripción involucrados. Esta vía de señalización da lugar a la activación de CREB, entre otros, lo que conduce a la inhibición de la transcripción de genes que codifican para moléculas relacionadas con inflamación, tales como los TNF α , IL-12 e iNOS, y a la activación de la transcripción de genes que codifican para moléculas anti-inflamatorias como IL-10 (Delgado y Ganea, 1999; Delgado *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1999f; Delgado *et al.*, 1999g; Leceta *et al.*, 2000). Además, a través de esta vía modula la expresión de otros neuropéptidos en los FLS (Pérez-García *et al.*, 2011).

La vía de señalización dependiente de PKA interacciona con otras vías de señalización son moduladas por VIP de manera dependiente de AMPc, tales como las vías de las enzimas MAPKs (Delgado y Ganea, 2000c) o Jak/STAT (Delgado y Ganea, 2000d), las cuales también están involucradas en la transcripción de genes de moléculas inflamatorias como, las anteriormente descritas, TNF α , IL-12 e iNOS.

Además de los mecanismos dependientes de AMPc, los efectos de VIP en el SI también están mediados por vía de señalización denominada **independiente de PKA** a través de la cual se inhibe la translocación de NF κ B al núcleo, impidiendo la activación de la transcripción génica de genes como los que codifican para TNF α e IL-12 (Leceta *et al.*, 2000). Esta vía involucra la enzima PKC, cuya activación por parte de VIP se ha mostrado en el SI, entre otros tipos celulares en macrófagos (De la Fuente *et al.*, 1993; De la Fuente *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, estudios *in vitro* han mostrado que VIP, señalizando a través de esta vía, da lugar a la modulación de la transcripción del gen de la IL-6 en macrófagos (Martínez *et al.*, 1998), así como otros tipos celulares como los FLS (Arranz *et al.*, 2008a; Arranz *et al.*, 2008b). Paralelamente, la activación de VIP de esta vía de señalización también se ha demostrado *in vivo* en un modelo de artritis experimental (Juarranz *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha mostrado que VIP también señala en el SI a través de otras enzimas y factores de transcripción. VIP es capaz de activar la vía de señalización de la PLC (Pozo *et al.*, 1997). La activación de esta enzima, con el consecuente incremento de los niveles de calcio, se ha relacionado con la estimulación de funciones celulares inmunes tales como la diferenciación o la proliferación

linfoide (Beckner y Farrar, 1988). De otra parte, otros factores de transcripción que también son modulados por VIP son IRF-1 (Delgado y Ganea, 2000d), IRF-3 (Carrion *et al.*, 2011), AP-1 (Juarranz *et al.*, 2005).

BLOQUE V: INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD

Tal y como se describe en el *Bloque I*, la inflamación generalmente surge debido a la presencia de patógenos o la existencia de daño tisular. Sin embargo, en ocasiones el proceso inflamatorio se desencadena en respuesta a moléculas endógenas que son reconocidas como agentes dañinos. Este reconocimiento de lo “propio” como “extraño” es lo que se denomina **autoinmunidad**. (Male *et al.* 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

Los factores genéticos y ambientales, tales como la infección o la lesión tisular, son los principales elementos que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad. La enfermedad autoinmune, dependiendo de la distribución del autoantígeno desencadenante de la respuesta, puede ser sistémica, como el lupus eritematoso sistémico o la artritis reumatoide, o específica de tejido, como la esclerosis múltiple o la diabetes autoinmune. Tanto en unas como en otras, el proceso autoinmune tiene lugar debido al fallo de los mecanismos de tolerancia, lo que permite que se establezca la inflamación. Esta respuesta inflamatoria involucra numerosos mecanismos efectores que son responsables de las lesiones tisulares causadas. Generalmente, la inflamación tienden a ser crónica, progresiva y a perpetuarse a sí misma. (Male *et al.* 2007; Murphy *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

Las enfermedades autoinmunes afectan a millones de personas en todo el mundo, por lo que su impacto sanitario, social, y económico es muy elevado. Por ello su estudio es objeto de un gran número de investigaciones científicas que tienen por finalidad dilucidar los mecanismos inmunológicos que se desarrollan durante el curso de estas enfermedades, así como proveer nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de los pacientes.

1. ARTRITIS REUMATOIDE

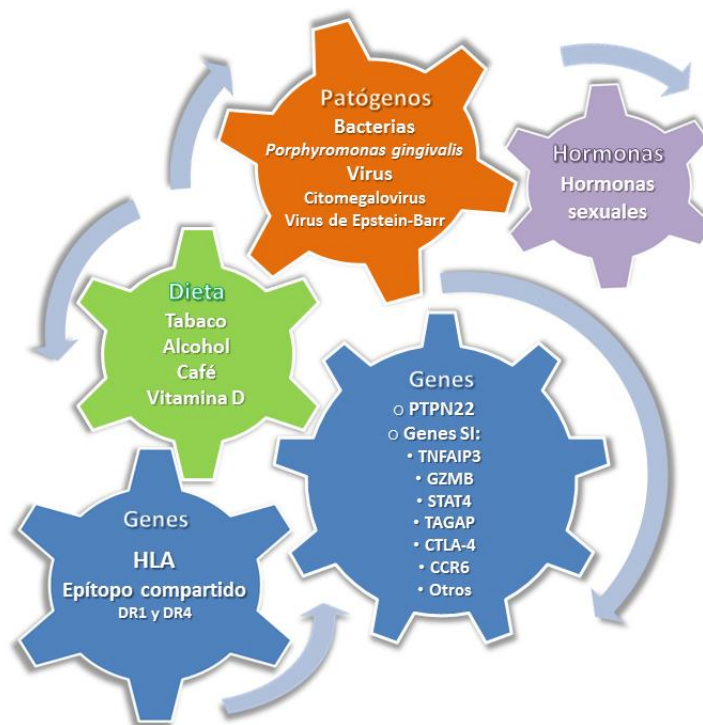
La AR es una enfermedad inflamatoria y autoinmune de sintomatología crónica y sistémica. Afecta fundamentalmente a las articulaciones, las cuales presentan una gran discapacidad funcional debido a su deformidad causada a lo largo del proceso inflamatorio. Si bien, la principal manifestación clínica se produce en las articulaciones, la AR puede afectar a distintos órganos y tejidos, por lo que se suele agrupar dentro de las enfermedades autoinmunes sistémicas.

Esta enfermedad presenta una elevada **prevalencia** mundial. Aunque ésta es variable dependiendo de la región, se sitúa en torno al 1%, presentando en España un valor de 0.5% en la población adulta (Carmona *et al.*, 2002). Puede comenzar a desarrollarse a cualquier edad, pero usualmente tiene lugar aproximadamente entre los 40 y los 60 años. En relación al género, es más frecuente en mujeres que en hombres, con una proporción de un hombre por cada tres mujeres.

Su **etiología** es desconocida aunque se supone un origen multifactorial que incluye factores genéticos, ambientales, infecciosos y hormonales (véase *Figura 25*). En relación a los **factores genéticos**, múltiples genes influyen tanto en la susceptibilidad como en la severidad de la enfermedad. El primer factor genético descrito asociado a la AR fue el HLA (Stastny, 1976; Stastny,

1978). Las primeras investigaciones dieron lugar a la hipótesis del epítipo compartido, indicando la existencia de una mayor frecuencia de la enfermedad entre los individuos que poseen determinados alelos HLA de clase DR1 y DR4, los cuales presentan la secuencia común denominada epítipo compartido (Gregersen *et al.*, 1987). Este epítipo compartido constituye un factor de mayor susceptibilidad y severidad de la enfermedad, así como un indicador de peor pronóstico y un factor de riesgo de aparición de manifestaciones extra-articulares (Weyand *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1996; Gonzalez-Gay *et al.*, 2002; Turesson *et al.*, 2005; Sanmarti *et al.*, 2007). Otro marcador genético asociado a la AR es la variación en el gen que codifica para PTPN22 (Begovich *et al.*, 2004). Muchos otros genes asociados con esta enfermedad, tales como la proteína inducida por factor de necrosis tumoral alfa 3 (TNFAIP3, del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein-2*), GZMB, STAT4, la proteína activadora de Rho GTPasa de activación de células T (TAGAP, del inglés *T-Cell Activation RhoGTPase Activating Protein*), CTLA-4 y CCR6 (Plenge *et al.*, 2005; Plenge *et al.*, 2007; Remmers *et al.*, 2007; Thomson *et al.*, 2007; Kochi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011b; Knevel *et al.*, 2013). De forma general se trata de genes relacionados con la inmunidad, mayoritariamente vinculados con mecanismos de presentación antigénica y activación de las células T.

Figura 25. Factores genéticos y ambientales asociados a la artritis reumatoide.



Nota: Resumen de los principales genes y factores ambientales relacionados con la ingesta o las infecciones víricas, asociados con el aumento de riesgo a padecer AR.

Referente a los **factores ambientales** que marcan susceptibilidad a padecer AR, el factor de riesgo más estudiado es el hábito de fumar, el cual se ha asociado a la producción de auto-anticuerpos (Ruiz-Esquide y Sanmartí, 2012). Se han definido también otros factores como el alcohol, el café o los

niveles de vitamina D (Heliovaara *et al.*, 2000; Merlino *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2006; Källberg *et al.*, 2009; Haque y Bartlett, 2010; Kerr *et al.*, 2011). Los agentes infecciosos bacterianos y víricos también se han relacionado a una mayor susceptibilidad frente a la AR. Dentro de los patógenos bacterianos, se ha descrito que *Porphyromonas gingivalis* puede constituir un estímulo para el desarrollo de la AR ya que la periodontitis, enfermedad causada principalmente por esta bacteria, es más frecuente en individuos que desarrollan AR (Rosentein *et al.*, 2004; de Pablo *et al.*, 2008; Lundberg *et al.*, 2010). Entre los agentes víricos se ha apuntado a citomegalovirus o virus de Epstein-Barr como posibles estímulos desencadenantes de la patología (Lossius *et al.*, 2012; Pierer *et al.*, 2012). Se han definido también otros factores ambientales asociados a riesgo o protección frente a la AR, aunque no existen evidencias concluyentes en todos los casos (véase *Figura V.2.1.*). Finalmente, se ha considerado también la importancia de los **factores hormonales** en la susceptibilidad frente a la enfermedad dada la mayor prevalencia de AR en mujeres, así como la mejoría durante el embarazo o el riesgo de padecer la enfermedad asociado a complicaciones en el embarazo, entre otras cuestiones relacionadas (Silman *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1993; Jørgensen *et al.*, 2014).

Acerca de las **manifestaciones clínicas** de la AR, la enfermedad se trata en realidad un síndrome que agrupa varios subtipos de enfermedad, englobando diferentes formas clínicas, radiológicas y serológicas. Generalmente la enfermedad comienza de forma insidiosa con astenia, anorexia y sintomatología musculoesquelética imprecisa. Posteriormente, se desarrolla la sinovitis y aparece de forma gradual la clínica específica. La inflamación afecta fundamentalmente a las articulaciones periféricas, distribuyéndose de forma bilateral y simétrica. Generalmente se inicia en las articulaciones de manos y pies, progresando después por otras articulaciones. Sus síntomas a nivel local son dolor y rigidez matutina, enrojecimiento, sensibilización y engrosamiento de la articulación y anquilosis en los estadios tardíos de la enfermedad. La AR presenta también manifestaciones extra-articulares que pueden estar localizadas en diversos órganos o ser sistémicas, como la fiebre, la fatiga, la anorexia y la pérdida de peso. Las manifestaciones extra-articulares pueden ser de diferentes tipos, tales como la aparición de nódulos reumatoides o lesiones granulomatosas en diferentes órganos, la vasculitis reumatoide o lesiones vasculares en el SNP, la piel u otros órganos, la aminoidosis, la anemia el síndrome de Felty o diversas manifestaciones pleuro-pulmonares, cardíacas, neurológica u oculares.

La evolución de la enfermedad es variable. La mayoría de los pacientes presenta una actividad de forma mantenida, aunque con un grado variable de deformidad articular. El desarrollo de la enfermedad es lento y progresivo y en la mayoría de los casos a lo largo de la enfermedad el paciente sufre periodos de exacerbación y remisión. La esperanza de vida en estos individuos se acorta y su mortalidad frecuentemente se asocia a una afectación articular grave.

Existen varios modelos animales para el estudio de la AR, en algunos de los cuales la artritis se genera de forma espontánea y en otros de forma inducida. Entre todos ellos, el mejor caracterizado y más empleado es el modelo murino de **artritis inducida por colágeno** o modelo CIA (Myers *et al.*,

1997). Comparte con la AR de humanos las características clínicas, histopatológicas e inmunes. Este modelo tiene una gran aceptación ya que es reproducible, está bien definido y se ha mostrado útil para el desarrollo de nuevas terapias para la AR. Además, el modelo CIA constituye un buen sistema para el estudio de la implicación de los linfocitos T en la patogenia de la AR.

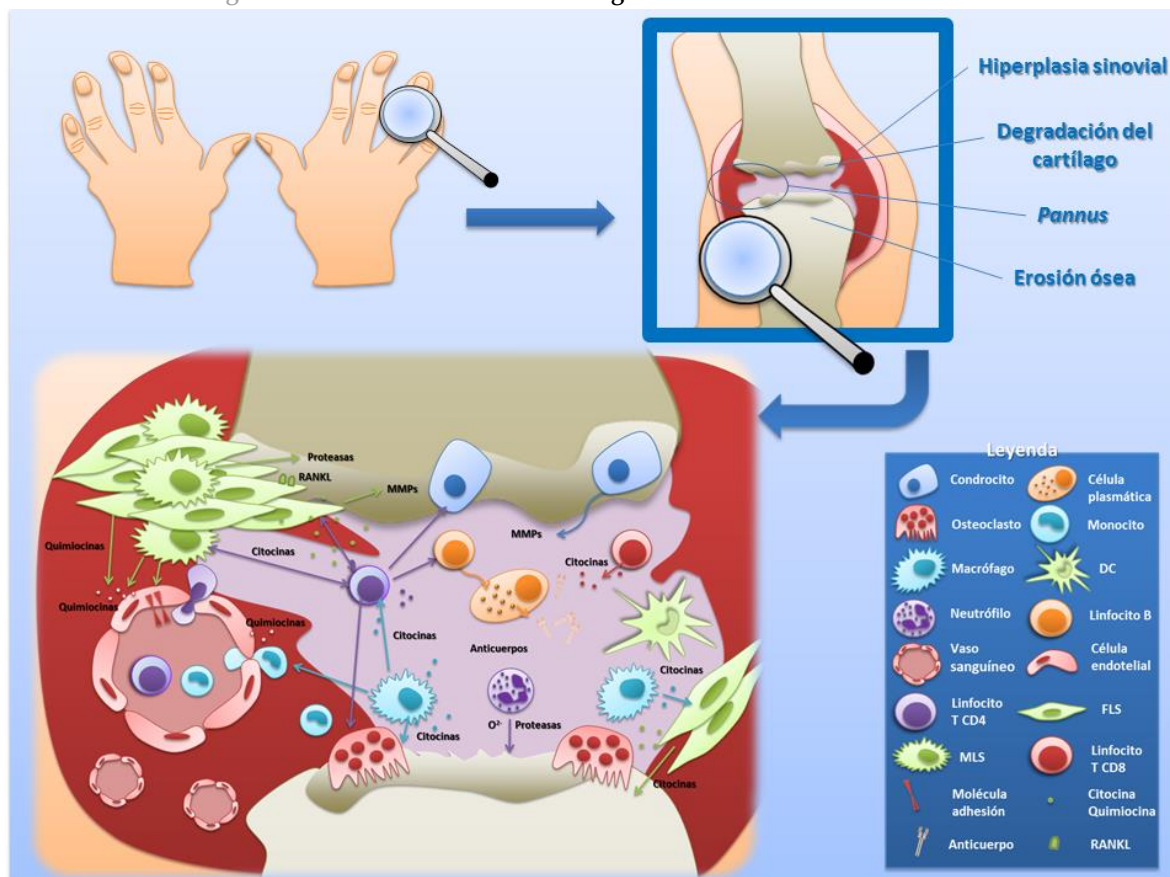
1.1. MANIFESTACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

La sintomatología descrita deriva de la respuesta inflamatoria progresiva y persistente que afecta a las membranas sinoviales de múltiples articulaciones periféricas, causando el deterioro del cartílago y del hueso y llevando finalmente a la destrucción de la articulación. En la patogenia de la enfermedad participan tanto células pertenecientes al SI innato y adaptativo como células residentes en la membrana sinovial, el hueso y el cartílago (véase *Figura 26*). En relación al SI, la respuesta inmunológica es llevada a cabo tanto por el componente celular y como humoral de la respuesta inmune. De hecho, se trata de una enfermedad autoinmune, siendo una de sus características la presencia en el suero de auto-anticuerpos (Feldmann *et al.*, 1996a; Lee y Weinblatt, 2001; Firestein, 2003; Boissier *et al.*, 2012).

1.1.1. Desarrollo de la respuesta inflamatoria en la artritis reumatoide

Dos características básicas definen la AR, la inflamación y la hiperplasia celular. En relación a la inflamación, la fisiopatología de la AR se basa en la activación anómala de procesos inflamatorios que afectan a todos los niveles de la respuesta inmunológica. El distintivo más importante de la AR es la inflamación de la membrana sinovial. La articulación está formada por el hueso, el cartílago y la membrana sinovial. Esta última es un tejido vascularizado que sella la articulación manteniendo la presión negativa y asegurando la presencia de fluidos lubricantes en el espacio sinovial. En condiciones normales, la membrana sinovial consta de dos tipos celulares que establecen interacciones recíprocas entre sí, los sinoviocitos de tipo macrofágico (MLS, del inglés *Macrophage-Like Synoviocyte*) y los sinoviocitos de tipo fibroblástico (FLS, del inglés *Fibroblast-Like Synoviocyte*). En tales condiciones, la cavidad sinovial está repleta de líquido sinovial, de composición viscosa y acelular, que se encarga de transportar oxígeno y nutrientes al cartílago y de lubricar la articulación. En la AR, la membrana sinovial se engrosa e hipertrofia debido, por una parte, a la invasión en el líquido sinovial de células inflamatorias (neutrófilos, monocitos y linfocitos T y B) y, por otra parte, a la proliferación de FLS (Lee y Weinblatt, 2001; Firestein, 2003; Boissier *et al.*, 2012; Komatsu y Takayanagi, 2012). En este estado la membrana sinovial pasa a ser llamada *pannus*. A medida que progresa la enfermedad, el *pannus* va invadiendo las estructuras articulares locales, lo que deforma la estructura de la articulación y finalmente da lugar a la destrucción del cartílago y el hueso.

Figura 26. Manifestaciones inmunológicas en la artritis reumatoide.



Nota: Resumen de los principales factores y tipos celulares involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria desencadenada en las articulaciones en la AR.

Los procesos inmunológicos y patológicos que conllevan finalmente la destrucción de la articulación se producen de forma simultánea y secuencial. Este desarrollo secuencial de acontecimientos hace posible que el proceso patológico desencadenado en las articulaciones pueda ser subdividido en tres fases. En una primera fase se produce la inflamación sinovial, caracterizada por la infiltración linfocítica, la proliferación de células sinoviales, el daño de pequeños capilares (tumefacción endotelial, hemorragias perivasculares, etc.) y la aparición del edema sinovial. Si la inflamación persiste, tiene lugar la segunda fase en la que se produce el desarrollo del *pannus*, que se extiende por la superficie de la articulación. En esta fase tiene lugar el daño en el cartílago y el hueso. Finalmente, se origina la fase de deformación e inmovilización articular. El tejido se convierte en un tejido fibroso (fibrosis) lo que produce una deformación de la articulación. La destrucción del cartílago y la fibrosis dan lugar a la inmovilización articular (anquilosis).

La patogenia se produce por tanto debido a la participación tanto de células inflamatorias como de células residentes en la articulación. De modo que múltiples células y mediadores inflamatorios se interrelacionan en un complejo entramado que, tras iniciar una respuesta inflamatoria anómala, mantiene y perpetúa los mecanismos que conducirán a la destrucción articular (Lee y Weinblatt, 2001; Firestein, 2003; Boissier *et al.*, 2012; Komatsu y Takayanagi, 2012). Diferentes células inflamatorias participan en el proceso de la destrucción articular. Los neutrófilos, constituyen el tipo celular más

abundante en el líquido sinovial y producen la liberación mediadores inflamatorios como proteasas y radicales libres de oxígeno que dan lugar a la degradación de la articulación (Cascão *et al.*, 2010). Los MLS, por su parte, son los principales efectores de la inmunidad innata involucrados en la sinovitis (Kennedy *et al.*, 2011). Su activación tiene lugar a través de citocinas, de la interacción con linfocitos T activados o de receptores característicos de la inmunidad innata como TLRs o NLRs (*NOD-Like Receptors*). Estas células secretan citocinas que conducen al desarrollo del proceso inflamatorio, siendo las principales citocinas producidas TNF α e IL-1 β . Ambas citocinas son potentes inductores de las funciones del *pannus*, ya que promueven la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas, citocinas y MMPs, lo que da lugar a un mayor reclutamiento linfoide, un aumento de la proliferación de FLS y una mayor activación de la osteoclastogénesis (Feldmann *et al.*, 2001). Otras células pertenecientes al SI innato, como los mastocitos o las células NK también se encuentran en el tejido sinovial reumatoide (Boissier *et al.*, 2012).

En relación a la inmunidad adaptativa, los linfocitos B y las células plasmáticas presentan funciones clave, sin embargo los linfocitos T son las células principalmente involucradas en la patogenia de la AR. Dentro del subconjunto T, aunque existe expresión de linfocitos T CD8, las células T CD4 de memoria son los linfocitos que se expresan mayoritariamente. La implicación de los linfocitos T CD8 en la AR, no se conoce con exactitud (Carvalho *et al.*, 2013), aunque en modelos animales se sabe que estas células inducen la síntesis de GZMB y citocinas pro-inflamatorias, las cuales mantienen la sinovitis crónica (Raposo *et al.*, 2010). En general los linfocitos T, y de forma particular los linfocitos Th, contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria fundamentalmente mediante la producción de citocinas que activan otras células implicadas en el mantenimiento de la inflamación y en la destrucción articular. Inducen la liberación de proteasas en MLS, FLS, condrocitos y osteoclastos, dando lugar al proceso de destrucción de la articulación. Por su función colaboradora, los linfocitos Th interaccionan también con células B, promoviendo la producción de anticuerpos. Además, los linfocitos B pueden actuar como APC hacia los linfocitos T, con lo que contribuyen a la síntesis de citocinas y quimiocinas que potencian la actividad de las células T y, por tanto, la inflamación (Nakken *et al.*, 2011). Los infiltrados celulares linfoides se organizan en el tejido sinovial o bien de forma difusa o en forma de agregados perivasculares, que en algunos casos, a largo plazo pueden formar auténticos centros germinales similares a los de los ganglios linfáticos (Weyland y Goronzy, 2003).

Por otro lado, el desarrollo de la AR es también dependiente de la activación de las células locales. En esta enfermedad se produce una proliferación característica de las células residentes del tejido sinovial (Bartok y Firestein, 2011). Este proceso de proliferación sinovial, junto con la migración de células inflamatorias, es necesario para causar el daño crónico. En la AR, la arquitectura sinovial se reorganiza y los sinoviocitos sufren cambios fenotípicos. La hiperplasia sinovial tiene lugar debido al aumento de MLS y FLS en la membrana sinovial. En relación a los MLS, no se conoce con exactitud el origen del incremento celular, aunque se cree que puede ser debido a la migración de nuevas células. Los FLS, por su parte, adquieren características propias de células tumorales, comportándose por

tanto de forma pseudotumoral, invadiendo y destruyendo los tejidos contiguos. Las causas de esta proliferación, que tampoco se conocen con precisión, incluyen la adquisición de resistencia a la apoptosis, la expresión de proteínas de estrés y la producción de sinoviolina. La proliferación se produce en respuesta al microambiente inflamatorio (presencia de citocinas o ligandos de TLR) y conduce a su vez a una amplificación del proceso inflamatorio, ya que estas células perpetúan el reclutamiento de células mieloides y linfoides, exacerbando la sinovitis. Así mismo, promueven también la destrucción del cartílago y el hueso. Por un lado, los FLS producen quimiocinas y citocinas que reclutan más células inflamatorias, principalmente macrófagos y linfocitos, mientras por otro lado producen daño articular mediante la secreción de endoproteinasas neutras como las MMPs y las serin proteasas, así como el ligando del receptor activador de NFκB (RANKL, del inglés *Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa Ligand*), causando daño en el cartílago y el hueso.

La destrucción del cartílago articular tiene lugar debido, a la inhibición, por una parte, de la síntesis de proteoglicano y colágeno, a la vez que se produce un aumento del catabolismo de la matriz extracelular. Esto se produce ya que la inflamación en el tejido sinovial adyacente provoca cambios en la actividad metabólica de los condrocitos. Las citocinas secretadas en el ambiente inflamatorio de la articulación, fundamentalmente IL-1β y TNFα, desregulan la función de los condrocitos, induciendo en ellos la producción de MMPs y otros medidores de degradación (Goldring, 2003). Junto con la destrucción del cartílago, se produce también la destrucción ósea articular. La pérdida del hueso asociada a la AR se atribuye fundamentalmente a la activación anómala de los osteoclastos, los cuales se encargan de la resorción de la matriz ósea (Vaananen y Laitala-Leinonen, 2008). La secreción de RANKL en la articulación inflamada da lugar a la estimulación de los osteoclastos y, una vez activados, éstos secretan varios mediadores pro-inflamatorios, como iNOS, que promueven la resorción del hueso y, por tanto, a la destrucción progresiva de la articulación (Goldring, 2002).

Otro proceso clave que tiene lugar en la respuesta inflamatoria crónica o sinovitis desarrollada en la articulación es la angiogénesis (Szekanecz *et al.*, 2009a; Szekanecz *et al.*, 2010a). En el tejido sinovial reumatoide este proceso se desarrolla en respuesta a diferentes estímulos que se encuentran presentes tales como la inflamación, la hipoxia, etc. La angiogénesis comienza con la producción de proteasas por parte de las células endoteliales activadas que degradan la membrana basal y como consecuencia las células endoteliales migran al tejido sinovial donde proliferan y se diferencian formando nuevos vasos. Estos vasos de nueva formación mantienen el estado crónico inflamatorio al transportar células inflamatorias y abastecer de oxígeno y nutrientes al *pannus*.

1.1.2. Mediadores solubles en la artritis reumatoide

El proceso inflamatorio que tiene lugar en la AR depende tanto de las interacciones celulares como de los mediadores solubles producidos por las células de la articulación y las células inmunes. Estos mediadores, entre los que se encuentran anticuerpos, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, actúan sobre las células adyacentes o a distancia, desempeñando una función

fundamental en el desencadenamiento y mantenimiento de la respuesta inmune inflamatoria característica de la AR.

Los principales **anticuerpos** producidos por los linfocitos B en la AR son el Factor Reumatoide (FR), compuesto por anticuerpos específicos frente a la región constante de las inmunoglobulinas (Jefferis y Mageed, 1989), y los anticuerpos frente a proteínas citrulinadas (anti-CCP o ACPA, del inglés *Anti-Citrullinated Peptide Antibody*) (Scott *et al.*, 2010, Boissier *et al.*, 2012).

La patogenia de la AR involucra también a numerosas **citocinas**, las cuales se activan en serie o en paralelo dando lugar a cascadas de acción que actúan de forma pleiotrópica y redundante (véase *Tabla 9*). Su participación en la patogenia de la AR es clave, tanto a nivel de la articulación como a nivel sistémico, ya que intervienen en la mayoría de los procesos inflamatorios que se producen (Feldman *et al.*, 1996b; Brennan y McInnes, 2008). En la cavidad sinovial de la articulación de la AR existe una alta expresión de numerosas citocinas, destacando entre ellas la producción de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-15 e IL-17 (Azizi *et al.*, 2013). Las citocinas más importantes involucradas en la respuesta inmune de la AR son TNF α e IL-1 β (Feldmann *et al.*, 2001; Iwakura, 2002; Brennan y McInnes, 2008). Como se menciona anteriormente, ambas citocinas son producidas mayoritariamente por MLS en respuesta a los estímulos inflamatorios y participan en numerosos procesos desarrollados en la articulación. A través de sus diversas funciones dan lugar a la potenciación de la inflamación y de la destrucción de la articulación mediante su contribución a la degradación de la matriz extracelular, la destrucción del cartílago y la resorción ósea. La IL-6 también se expresa de forma elevada en la articulación, donde actúa a diferentes niveles promoviendo la respuesta inmunológica en la articulación. Además, está involucrada en la respuesta sistémica de la inflamación, fundamentalmente mediante la inducción de la expresión de proteínas de fase aguda (Assier *et al.*, 2010). La IL-15 es otra citocina involucrada en la respuesta inflamatoria desarrollada en la AR (McInnes y Leung, 2001; Carroll *et al.*, 2008). Por su parte, la IL-17 desempeña una función crucial en la patología de la AR. Esta citocina ejerce numerosas funciones, participando tanto en el proceso inflamatorio como en la inducción de la destrucción del cartílago y el hueso (véase *Bloque V. Apartado 3.1.*). También otras como IL-18 e IFN γ ejercen múltiples funciones en la AR (Liew *et al.*, 2003; McInnes *et al.*, 2005; Brennan y McInnes, 2008; Gabay y McInnes, 2009; Schurgers *et al.*, 2011). Finalmente, citocinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-13, IL-4 y TGF β , se encuentran también expresadas en la AR (Van Roon *et al.*, 2001). Se trata de un mecanismo compensatorio natural cuyo fin es controlar la respuesta inflamatoria. Sin embargo, este mecanismo resulta insuficiente dada la alta capacidad reactiva y destructiva del *pannus*.

Tabla 9. Citocinas involucradas en el desarrollo de la artritis reumatoide.

Citocina	Funciones biológicas
TNF α e IL-1 β	Estimulan la producción de mediadores inflamatorios: ✓ Prostaglandinas ✓ ON ✓ Citocinas (ej: IL-6) ✓ Moléculas de adhesión (ej: VCAM-1, ICAM-1) ✓ Factores de crecimiento (ej: PDGF, FGF)
	Inducen el reclutamiento de células inflamatorias.
	Promueven la proliferación de los FLS.
	Favorecen los procesos de angiogénesis.
IL-6	Promueve la activación leucocitaria.
	Induce la producción de anticuerpos.
	Estimula la activación de los FLS y los osteoclastos.
IL-15	Induce el crecimiento de los linfocitos T.
	Favorece la activación de los neutrófilos, las células NK y las células endoteliales.
	Promueve la supervivencia de los FLS.
	Conduce a la producción de otras citocinas.
IL-18	Induce la producción de mediadores inflamatorios: ✓ Citocinas (ej: IFN γ , TNF α y IL-32) ✓ Quimiocinas ✓ ON ✓ Factores de crecimiento (ej: GM-CSF) ✓ Otros
	Participa en la inducción de la diferenciación de las células Th1.
	Inhibe la proliferación de los condrocitos.
	Estimula la angiogénesis.
IFN γ	Promueve la producción de anticuerpos.
	Estimula la síntesis de citocinas como TNF α e IL-1 β .
	Induce la diferenciación de las células Th1.

Nota: Resumen de las principales acciones de las citocinas mayoritariamente involucradas en el desarrollo de la AR.

Numerosas **quimiocinas** se han relacionado con el proceso inflamatorio desencadenado en la AR, tales como CXCL1, CXCL7, CXCL8, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL16, CCL2, CCL3, CCL5, CCL19 y CCL21 (Vergunst y Tak, 2005; Szkanecz *et al.*, 2010b; Szkanecz *et al.*, 2011). Generalmente su función se ha asociado al reclutamiento al sinovium de células inflamatorias tales como neutrófilos, linfocitos T, monocitos y macrófagos, con lo que participan en el proceso de inflamación y destrucción tisular. Sin embargo, también desempeñan otras funciones relacionadas con la patología de la AR, como la formación de estructuras linfoides terciarias (Manzo *et al.*, 2005; Corsiero *et al.*, 2012) o la angiogénesis de la membrana sinovial (Szkanecz *et al.*, 2009b).

Otros mediadores solubles implicados en la patogenia de la AR son los **factores de crecimiento**, tales como GM-CSF, G-CSF, M-CSF, PDGF y FGF. Estos factores están involucrados en los procesos de proliferación y diferenciación celular que tienen lugar en las articulaciones inflamadas (Rommers *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1995; Malemud, 2007; Cornish *et al.*, 2009). Finalmente, como ya se ha descrito, hay además una elevada producción de **MMPs**, las cuales están fundamentalmente implicadas en la destrucción de la articulación a través de la degradación del cartílago y el hueso (Yoshihara y Yamada, 2007).

1.2. ARTRITIS REUMATOIDE Y LINFOCITOS T COLABORADORES

Los linfocitos Th son una población celular clave en la patogenia de la AR. A pesar de la importante función de otras células inmunes como macrófagos y neutrófilos, las células Th desempeñan una función destacada participando tanto el desarrollo de la respuesta inflamatoria como en la destrucción articular. No obstante, ha sido complicado conocer con exactitud su función en la AR debido fundamentalmente al desconocimiento acerca de los antígenos que causan su activación. A pesar de ello, numerosos hallazgos han manifestado la importante implicación de este tipo celular en la patogenia de la enfermedad. Tales evidencias son (Cope *et al.*, 2007; Boissier *et al.*, 2012; Komatsu y Takayanagi, 2012):

- ❖ Las células T ejercen una función crucial en el desarrollo de la patogenia de la AR en diversos modelos animales de artritis, como el modelo CIA.
- ❖ Los factores genéticos asociados a la mayor susceptibilidad o severidad de la enfermedad son mayoritariamente genes implicados en la presentación antigénica o en la activación y función de los linfocitos T.
- ❖ La AR es una enfermedad autoinmune, por tanto, caracterizada por la producción de auto-anticuerpos. Las células Th están implicadas en la autoinmunidad dada su función colaboradora con los linfocitos B en la producción de inmunoglobulinas.
- ❖ Existe un elevado número de linfocitos T en la membrana sinovial reumatoide.
- ❖ Las citocinas secretadas por linfocitos T muestran una función importante en el desarrollo de la enfermedad.
- ❖ El éxito de la terapia con abatacept ha mostrado la importante función de estas células en la patogenia de la AR.

Clásicamente la AR fue considerada como una enfermedad mediada por células productoras de IFN γ . Dado que las primeras investigaciones acerca de la implicación de las subpoblaciones Th en la patogenia de la AR se realizaron en el marco del paradigma Th1/Th2, se apuntó hacia la clasificación de la AR como una enfermedad de tipo **Th1** (Miltenburg *et al.*, 1992; Schlaak *et al.*, 1992; Quayle *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1993; Dolhain *et al.*, 1996). Fundamentalmente, lo que indicó hacia la implicación de la subpoblación Th1 en la AR fue la presencia de IFN γ . Esta citocina, entre otras funciones, es capaz de activar macrófagos, contribuyendo al proceso inflamatorio al inducir el aumento de la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IL β (Kelchtermans *et al.*, 2008). En paralelo a la expresión de

IFN γ , los primeros estudios mostraron también una implicación de la IL-12 en la patogenia de la AR (Germann *et al.*, 1995; Bucht *et al.*, 1996; McIntyre *et al.*, 1996; Malfait *et al.*, 1998). A pesar de que todos estos datos establecieron la hipótesis de que la AR era una enfermedad mediada por linfocitos de tipo Th1, los estudios posteriores dieron lugar a resultados contradictorios (Manoury-Schwartz *et al.*, 1997; Vermeire *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2003; Irmeler *et al.*, 2007). Se describió que ratones artríticos deficientes para IFN γ o su receptor o aquellos que eran tratados con anticuerpos anti-IFN γ , presentaban una mayor susceptibilidad a padecer AR y una mayor severidad en la sintomatología. En tales casos, la enfermedad no sólo no se bloqueaba, sino que se aceleraba el curso de la misma. Se observó que en tales ratones tanto IFN γ como otras citocinas de tipo Th1 se detectan en la membrana sinovial de la AR a niveles muy bajos, mucho menores que otras citocinas como TNF α , IL-1 β o IL-6. Sumado a ello, se describió la existencia de la IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000). En este sentido, se había mostrado que el tratamiento de ratones artríticos con anticuerpos anti-IL-12p40 suprimía el desarrollo de la enfermedad (McIntyre *et al.*, 1996). Este bloqueo se había atribuido a la obstaculización del efecto de la citocina IL-12, pero posteriormente se ha postulado que era debido a un efecto sobre la IL-23, ya que los ratones deficientes en la subunidad IL-23p19 eran resistentes a desarrollar CIA (Murphy *et al.*, 2003; Ratsimandresy *et al.*, 2011). Dado que la IL-23 es una citocina involucrada en el desarrollo de la subpoblación linfoide **Th17**, el descubrimiento de la implicación de tal citocina en la patogenia de la AR ha apuntado hacia la importancia de esta subpoblación en el desarrollo de la enfermedad. Apoyando tal hipótesis surgieron diversas evidencias. En relación con los experimentos mencionados sobre ratones artríticos deficientes para IFN γ o tratados con anticuerpo anti-IFN γ , la exacerbación de la respuesta inflamatoria iba asociada a un aumento de los niveles de expresión de IL-17, los cuales eran mayores que los de IFN γ (Irmeler *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2009). Además, estudios realizados en ratones deficientes para IL-17, así como en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-17, han mostrado una disminución o incluso bloqueo de la AR (Nakae *et al.*, 2003; Lubberts *et al.*, 2004; Irmeler *et al.*, 2007; Kelchtermans *et al.*, 2009a). En la misma dirección, ratones deficientes para IL-21R tampoco desarrollan la enfermedad en un modelo murino de artritis espontánea (Jang *et al.*, 2009). Todas estas evidencias indican una función importante de las células Th17 en la patogenia de la enfermedad. No obstante, en la AR se encuentran células de tipo Th1 y Th17, así como células con fenotipo intermedio. Además, se han descrito ambos tipos de modelos animales, tanto dependientes de células Th1 como dependientes de células Th17. De tal manera que permanece en debate cuál de las dos poblaciones está implicada mayoritariamente en el desarrollo de la enfermedad. Es decir, si la patogenia de la AR está mediada por células Th1, células Th17 o ambos tipos celulares, o si ello varía en función de las fases de la enfermedad. (Véase *Bloque V. Apartado 4.2.*).

Por otro lado, otras células Th, como los linfocitos Treg y Th2 también están implicados en la AR. Estas células presentan funciones moduladoras y beneficiosas en la patogenia de dicha enfermedad. En cuanto a las células **Treg**, se ha mostrado que éstas se hallan presentes en los pacientes con AR, encontrándose en niveles elevados en el líquido sinovial (Cao *et al.*, 2003; de Kleer *et al.*, 2004; van Amelsfort *et al.*, 2004; Möttönen *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2006). Su efecto beneficioso

sobre el desarrollo de la AR se ha comprobado en diversos estudios realizados en modelos animales de AR (Morgan *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005; Ngugen *et al.*, 2007; Kelchtermans *et al.*, 2009b; Wright *et al.*, 2009). Sin embargo, no todos los modelos animales parecen responder a la manipulación de las células Treg (Bardos *et al.*, 2003). Además, se han encontrado también resultados controvertidos en relación al número de linfocitos Treg presentes en sangre periférica entre los distintos estudios en pacientes con AR (Cao *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; van Amelsfort *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Möttönen *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008). Más unánime es la idea de que las células Treg presentan un déficit en su función en los individuos que padecen AR. Se ha mostrado que las células Treg circulantes en los pacientes con AR son capaces de suprimir la proliferación de los linfocitos T (van Amelsfort *et al.*, 2004; Möttönen *et al.*, 2005), sin embargo no pueden suprimir la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IFN γ por parte de los linfocitos T efectoros y los monocitos (Ehrenstein *et al.*, 2004; Valencia *et al.*, 2006). Para explicar este déficit funcional se ha postulado que las células Treg se ven fuertemente influenciadas por el ambiente inflamatorio de la articulación afectada, siendo su función inhibida por la existencia de elevada co-estimulación así como por las citocinas del ambiente inflamatorio (Pasare y Medzhitov, 2003; Valencia *et al.*, 2006; van Amelsfort *et al.*, 2007). Sin embargo, también se ha mostrado que citocinas pro-inflamatorias producidas por monocitos inducen en células Treg la expresión de otras citocinas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias a la vez que estimulan la actividad supresora (Walter *et al.*, 2013). Por otro lado, además del déficit en el número de células Treg, así como el defecto funcional o fenotípico de estas células, también se ha postulado como causa de la disfunción de la función reguladora en la AR que las células T efectoras de la articulación presentan una menor sensibilidad a la supresión de las células Treg que sus homólogas de sangre periférica (Baecher-Allan *et al.*, 2002; van Amelsfort *et al.*, 2004; Haufe *et al.*, 2011; Wehrens *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011). A pesar de los datos contradictorios y la escasez de resultados en algunas áreas, las terapias que incluyen la manipulación, inducción o expansión de células Treg en el tratamiento de la AR se encuentran actualmente en investigación dado su potencial para reducir la AR (Cooles *et al.*, 2013).

En relación al subtipo **Th2**, se ha descrito que la IL-4 presenta una función reguladora en la patogenia de la artritis en CIA (Myers *et al.*, 2002). Esta citocina, es capaz *in vitro* de inhibir la proliferación de los FLS procedentes de pacientes con AR (Dechanet *et al.*, 1993). Así mismo se ha mostrado que existe una asociación entre variantes genéticas de la IL-4 o su receptor y la severidad o riesgo a padecer AR (Pawlik *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007; Hussein *et al.*, 2013; Krabben *et al.*, 2013). En la misma línea, se ha observado que ratones transgénicos para GATA3, que presentan un aumento en la expresión de citocinas de tipo Th2, especialmente IL-4, muestran una reducción en la inflamación y la erosión ósea (van Hamburg *et al.*, 2009). Por otro lado, algunos trabajos han indicado que pacientes con AR que presentan una situación que cursa con una respuesta de tipo Th2, como el embarazo, muestran una mejoría en la inflamación de las articulaciones (Straub *et al.*, 2005).

Finalmente, otro subtipo de linfocitos Th de reciente descubrimiento también se ha visto involucrado en la patogenia de la AR, el subconjunto **Th22**. Se ha sugerido que esta subpoblación

celular contribuye a la patogénesis de la AR ya que se han observado elevados niveles de células Th22 e IL-22, los cuales se correlacionan con parámetros clínicos que indican severidad de la enfermedad en los pacientes con AR (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012a; Zhao *et al.*, 2013). En relación a los mecanismos celulares causantes de daño articular, se ha mostrado que esta citocina induce un incremento en la proliferación y la expresión de MMPs y alarminas en los FLS (Carrión *et al.*, 2013).

En suma, existen muchas evidencias que muestran la importante implicación de los diferentes subconjuntos de células Th en la patogenia de la AR. No obstante, los recientes descubrimientos de nuevos subtipos Th están generando la necesidad de nuevos análisis para el estudio del proceso patológico, así como el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

1.3. TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

El tratamiento de la AR tiene por finalidad aliviar el dolor, disminuir la inflamación, proteger las estructuras articulares, mantener o restablecer la funcionalidad de las articulaciones y controlar la afectación sistémica y extra-articular de la enfermedad. Se trata por tanto de un tratamiento multidisciplinar que abarca fisioterapia, farmacología y cirugía. En relación al tratamiento farmacológico, se han llevado a cabo, con mayor o menor eficacia, distintos abordajes clínicos que incluyen diversos fármacos.

El tratamiento sintomatológico puede consistir básicamente en la administración de analgésicos o, mayoritariamente, anti-inflamatorios no esteroideos con objeto de reducir el dolor. Sin embargo, otro tipo de fármacos, mucho más empleados para la AR, son los denominados **fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad** (DMARDs, del inglés *Disease-Modifying AntiRheumatic Drugs*) (Donahue *et al.*, 2008; Tanaka y Yamanaka, 2013). Se trata de fármacos inmunosupresores inespecíficos que frenan o retrasan la destrucción articular y que generalmente se emplean de forma combinada. Dentro de este grupo se encuentran diversos fármacos, como el metotrexato, que es el más empleado, la sulfasalazina, la leflunomida o la hidroxicloroquina, entre otros.

Los **agentes biológicos** son otro tipo de medicamentos empleados en la AR. Generalmente las terapias con agentes biológicos están basadas en el uso de citocinas o anticuerpos frente a determinadas citocinas, con el objetivo común de inhibir la acción de citocinas pro-inflamatorias (Breedveld, 1999). La primera diana de estas terapias fue la citocina TNF α , la cual ha sido objeto del desarrollo de múltiples fármacos (Alonso-Ruiz *et al.*, 2008). Para su inhibición se han empleado receptores solubles recombinantes como etanercept (Lethaby *et al.*, 2013) o anticuerpos anti-TNF α como infliximab (Smolen y Emery, 2011). Seguido del desarrollo de terapias anti-TNF α , se diseñaron también terapias frente a la citocina IL-1 β (Bresnihan *et al.*, 1998) e IL-6 (Patel y Moreland, 2010). Sin embargo, también se han empleado inhibidores de otras citocinas como por ejemplo IL-17 (Genovese *et al.*, 2010). Por otro lado, el empleo de citocinas inmunosupresoras tal como IL-10 también ha constituido una estrategia terapéutica en el AR (St Clair, 1999). Además de citocinas, las quimiocinas y

especialmente sus receptores, también han sido objeto terapéutico en la AR (Reynolds *et al.*, 2014). Otro tipo de agentes biológicos tiene como diana terapéutica a moléculas de superficie expresadas en diferentes células involucradas en la patogenia de la enfermedad. Así, rituximab, un anticuerpo anti-CD20 (molécula expresada en los linfocitos B) y abatacep, una molécula de fusión CTLA4-Ig que bloquea la co-estimulación del linfocito T, han sido empleados como fármacos en la AR (Scher, 2012; Caporali *et al.*, 2014). En los últimos años, se han diseñado también tratamientos con agentes biológicos cuya diana son moléculas de señalización intracelular de conocida implicación en el desarrollo de la AR, tales como proteína cinasas como JAK o SYK (Weinblatt *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2009; Yazici y Regens, 2011).

En resumen, el área de la inmunoterapia para el tratamiento de la AR ha crecido enormemente en los últimos años, abarcando desde el tratamiento frente a citocinas, células y moléculas de señalización celular, hasta incluso terapia celular con células mesenquimales estromales, DC tolerogénicas o células Treg (Reynolds *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de que todas estas terapias constituyen una promesa para el tratamiento de la AR, no poseen una eficacia completa, presentan graves efectos secundarios y elevada toxicidad, y dan lugar a un alto riesgo de adquisición infecciones. Es por ello que en la actualidad se sigue investigando fervientemente acerca de nuevas dianas terapéuticas que consigan eficacia clínica evitando tales inconvenientes.

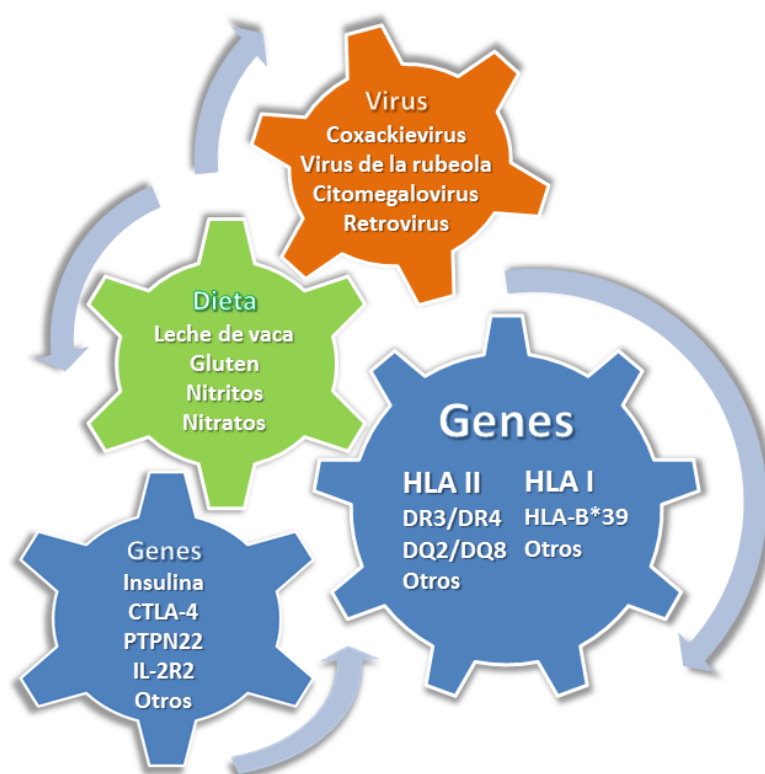
2. DIABETES AUTOINMUNE

La diabetes mellitus insulino-dependiente o T1D es una enfermedad autoinmune crónica de tipo metabólica, producida por el déficit de insulina, lo que origina alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

Esta enfermedad muestra una **prevalencia** muy elevada. Afecta a millones de personas en todo el mundo y en general, al menos en la mayoría de países europeos, la tasa de incidencia se encuentra en aumento (Patterson *et al.*, 2009). Normalmente comienza antes de los 30 años, por lo que también se denomina diabetes juvenil, aunque puede ocurrir a cualquier edad.

La **etiología** de esta enfermedad no se conoce con exactitud. Se trata de una enfermedad multifactorial que parece deberse a una combinación de la predisposición genética y la presencia de uno o más factores ambientales (véase *Figura 27*).

Figura 27. Factores genéticos y ambientales asociados a la diabetes autoinmune.



Nota: Resumen de los principales genes y factores ambientales relacionados con la ingesta o las infecciones víricas asociados con el aumento de riesgo a padecer diabetes autoinmune.

Se han descrito diversos **factores genéticos** relacionados con el riesgo de padecer T1D, entre los cuales destaca fundamentalmente su asociación con los genes de la familia del antígeno leucocitario humano (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*) (Mehers y Gillespie 2008; Concannon *et al.*, 2009; Pociot *et al.*, 2010; van Belle *et al.*, 2011). Distintos loci dentro de esta familia se asocian con un mayor riesgo de padecer la enfermedad, siendo la región más asociada HLA de clase II (Noble y Valdes, 2011). Varios genes HLA de clase II se han encontrado asociados al riesgo de padecer la enfermedad, entre los que destacan las formas DR y DQ, fundamentalmente los alelos DR3/DR4-DQ2/DQ8 (Noble y Valdes, 2011). Sumado a ello, también se ha mostrado asociación con alelos de clase I, de tipo HLA-A y HLA-B, como por ejemplo HLA-B*39 (Nejentsev *et al.*, 2007; Howson *et al.*, 2009). Por otro lado, se han identificado otros genes asociados a la susceptibilidad a padecer esta enfermedad tales como los genes que codifican para insulina, CTLA-4, proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (PTPN22, del inglés *Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor type 22*) e IL-2R2, entre otros (Kristiansen *et al.*, 2000; Vaidya y Pearce, 2004; Bottini *et al.*, 2006; Mehers y Gillespie 2008; Concannon *et al.*, 2009; Pociot *et al.*, 2010; van Belle *et al.*, 2011; Cerosaletti y Buckner, 2012).

Los **factores ambientales** también constituyen un factor de riesgo de padecer diabetes en individuos genéticamente susceptibles. Por un lado, se han descrito factores relacionados con la **ingesta de alimentos**, tales como la leche de vaca, el gluten de los cereales, los nitritos y nitratos o la

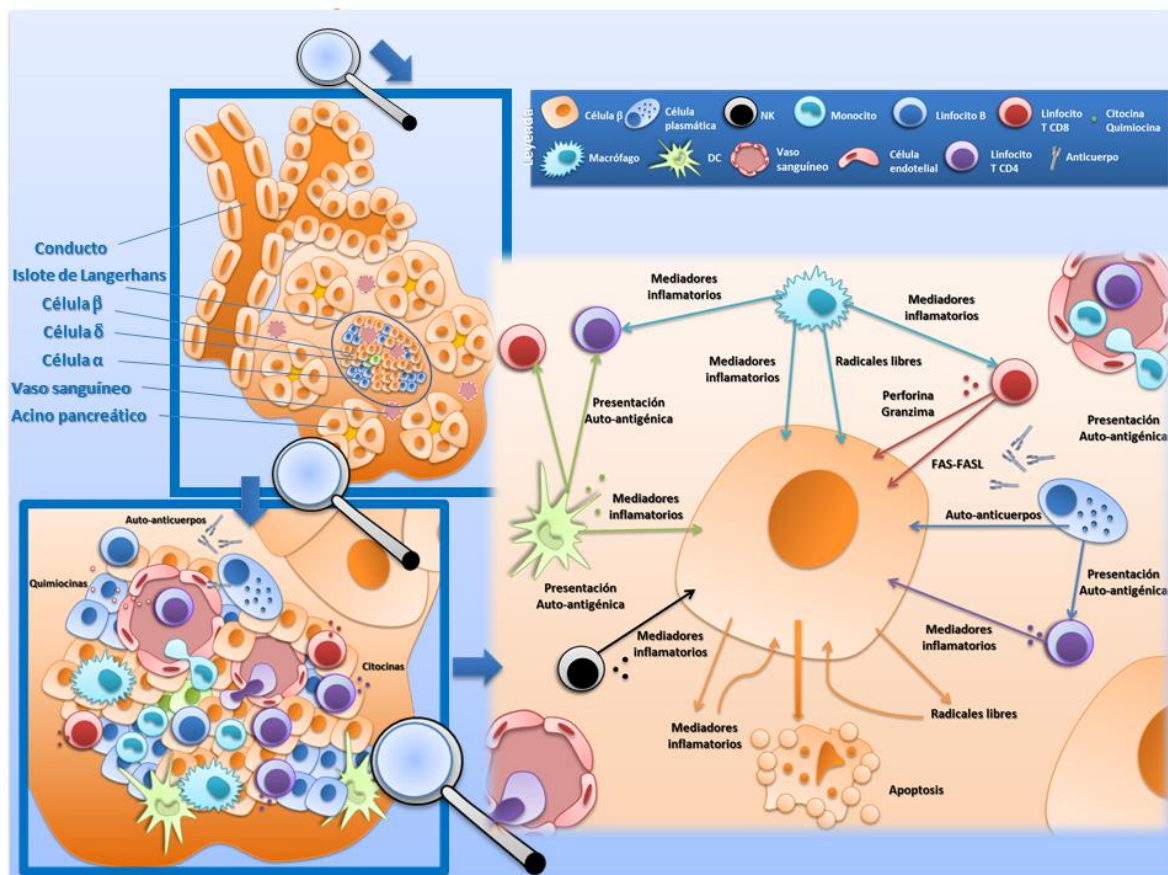
deficiencia de vitamina D (Knip y Simell, 2012; Nielsen *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha mostrado la asociación de diversos **patógenos** con el riesgo de padecer T1D. Referente a las **infecciones víricas**, mayoritariamente la susceptibilidad frente a T1D se ha asociado a las infecciones causadas por enterovirus, más específicamente por coxsackievirus (Richer y Horwitz, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Knip y Simell, 2012; Nielsen *et al.*, 2014). No obstante, otros virus están relacionados con la aparición de T1D, tales como rotavirus o virus de la rubeola, entre otros (van Belle *et al.*, 2011; Knip y Simell, 2012). Además de patógenos víricos, diversas **bacterias** se han relacionado con la susceptibilidad frente a la T1D, mostrándose una relación entre la composición de la microbiota intestinal y el riesgo a padecer la enfermedad (van Belle *et al.*, 2011; Knip y Simell, 2012; Nielsen *et al.*, 2014).

Las **manifestaciones clínicas** de la diabetes autoinmune son diversas. Los pacientes presentan un déficit de insulina resultado de la destrucción de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans. Debido a este déficit se pierde el control de los niveles de glucosa en sangre dando lugar a una hiperglucemia. El fallo metabólico conlleva el desarrollo de un gran número de complicaciones secundarias que incluyen cetoacidosis, fracaso renal, enfermedad cardíaca, accidente cerebro-vascular y ceguera. Debido a la afectación de todos estos órganos, los pacientes presentan, entre otros síntomas, excesiva sed y hambre, aumento de la producción de orina y pérdida de peso.

2.1. MANIFESTACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA DIABETES AUTOINMUNE

La T1D se caracteriza por una respuesta inmune adaptativa específica frente a las células β pancreáticas (véase *Figura 28*). La respuesta inmune, que implica la activación de células T auto-reactivas y el desarrollo de una respuesta humoral mediada por auto-anticuerpos, da lugar a la infiltración linfocitaria o inflamación en los islotes pancreáticos, es decir, la **insulitis**. (Pirrot *et al.*, 2008; Eizirik *et al.*, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Wållberg y Cooke, 2013; Szablewski, 2014).

Figura 28. Manifestaciones inmunológicas en la diabetes autoinmune.



Nota: Resumen de los principales factores y tipos celulares involucrados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria desencadenada en los islotes de Langerhans en la T1D.

2.1.1. Desarrollo de la respuesta inflamatoria en la diabetes autoinmune

Esta enfermedad cursa con dos fases, una primera fase precursora que precede al comienzo de los síntomas clínicos y una segunda fase que da lugar a la diabetes manifiesta. Durante la primera fase se produce la interacción inicial entre los factores genéticos y ambientales, desencadenándose una respuesta inmune auto-reactiva dirigida contra las células de los islotes. La aparición de los auto-anticuerpos es el primer signo previo al comienzo de la sintomatología. Una vez iniciada la respuesta auto-inmune, se produce un “diálogo” entre las diferentes células inmunes así como entre ellas y las células β pancreáticas durante el curso de la insulinitis. De una parte las células inmunes innatas y adaptativas producen citocinas que promueven la respuesta de las células de los islotes y éstas a su vez producen citocinas y quimiocinas que potencian aún más el reclutamiento y la activación linfocitaria. Este “círculo vicioso” conduce a una insulinitis severa que da lugar a la destrucción de las células β pancreáticas, lo cual va seguido de una pérdida creciente en la producción de insulina. La progresión de la diabetes resulta en una gran destrucción de las células de los islotes desencadenada por el desarrollo de una respuesta T pro-inflamatoria masiva que conduce finalmente a la sintomatología. Las manifestaciones clínicas aparecen tras la destrucción de gran parte de las células β pancreáticas, momento en el cual se produce la hiperglucemia que da lugar al resto de la sintomatología. (Pirrot *et*

al., 2008; Eizirik *et al.*, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Askenasy y Askenasy, 2013; Wållberg y Cooke, 2013; Szablewski, 2014).

Las **células β** pancreáticas participan en el proceso de destrucción de los islotes. Estas células son una importante fuente de producción de varias citocinas y quimiocinas durante el desarrollo de la insulinitis. Expuestas a IFN γ e IL-1 β , las células β pancreáticas incrementan la expresión de citocinas inflamatorias tales como IL-15 e IL-6 (Cardozo *et al.*, 2001) y diversas quimiocinas, fundamentalmente CCL2, CCL20, CXCL10 y CX3CL1 (Cardozo *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Cardozo *et al.*, 2005). Además, la exposición de las células β pancreáticas al ambiente inflamatorio desencadena la expresión de iNOS, lo que conduce a una producción masiva de ON que a su vez promueve la producción de proteínas de estrés (Cardozo *et al.*, 2005). La generación de estas proteínas contribuye a la destrucción de las células de los islotes (Eizirik *et al.*, 2008). La secreción de estos mediadores inflamatorios contribuye al reclutamiento y a la activación de las células mononucleares en el interior de los islotes, promoviendo por tanto el desarrollo de la insulinitis. A su vez, estas células reclutadas a los islotes conducen a la destrucción de los mismos. Este proceso de muerte de las células β de los islotes promueve aún más el desarrollo de la respuesta inmune pancreática. Los productos liberados tras la muerte de estas células pueden ser percibidos como señales de daño por el SI y los antígenos liberados, especialmente en presencia de los mediadores inflamatorios, que pueden ser presentados por las APCs en los nódulos linfáticos pancreáticos y desencadenar la respuesta linfoide autoinmune (Blachère *et al.*, 2005).

La muerte de estas células tiene lugar fundamentalmente mediante procesos de apoptosis. Varios mecanismos están involucrados en la promoción de la apoptosis y por tanto en la destrucción de las células β pancreáticas (Eizirik y Mandrup-Poulsen, 2001; Cnop *et al.*, 2005):

- ❖ La expresión de Fas-FasL en la superficie de las células β y las células T respectivamente, da lugar a la apoptosis de las células de los islotes.
- ❖ La liberación de perforina y GZMB por linfocitos T citotóxicos activados conduce a la apoptosis de las células β pancreáticas.
- ❖ La secreción de citocinas como la IL-1 β , TNF α e IFN γ por parte de células Th u otras células inmunes infiltradas en los islotes también conlleva la apoptosis de estas células.
- ❖ La producción de radicales libres por los macrófagos, las DCs y las propias células β pancreáticas también promueve la apoptosis de las células de los islotes.

Las principales células efectoras de esta destrucción de las células β pancreáticas son los linfocitos Th, los CTLs y los macrófagos. De tal modo que, la respuesta inmune que da lugar al proceso patológico involucra a las células pertenecientes al SI innato y adaptativo. Por un lado, las células de la inmunidad innata producen citocinas que promueven la apoptosis de las células β pancreáticas e incrementan la infiltración de células del SI adaptativo. Por otro lado, los linfocitos reclutados causan a su vez la destrucción de las células β a través de diversos mecanismos. Esta

participación de células de ambas respuestas inmunes es evidente en el análisis de los infiltrados celulares pancreáticos. Éstos presentan células pertenecientes a ambas respuestas, principalmente macrófagos, células T CD4 y CD8 y linfocitos B (Thayer *et al.*, 2010; Driver *et al.*, 2012).

Los **macrófagos** están involucrados en la respuesta inflamatoria que inicia la insulitis y la muerte de las células β pancreáticas. Se ha descrito que su eliminación o la prevención de la invasión de los islotes por los macrófagos conlleva la prevención de la diabetes (Oschilewski *et al.*, 1985; Hutchings *et al.*, 1990). Estas células pueden ejercer su función de forma indirecta activando células Th y T citotóxicas a través de la presentación antigénica, mediante señales de co-estimulación o gracias a la secreción de citocinas, o como células efectoras. En relación a su función indirecta, se ha descrito que los macrófagos, mediante la secreción de IL-12, promueven el desarrollo de los CTLs, así como para la generación de células Th auto-reactivas que secretan IFN γ e IL-2 (Jun *et al.*, 1999a). En modelos experimentales se ha descrito que su función en la inducción de los linfocitos T citotóxicos es clave ya que la eliminación de los macrófagos conduce a un menor potencial citotóxico (menor expresión de FasL y perforina), el cual se recupera cuando se reincorporan los macrófagos (Jun *et al.*, 1999a; Jun *et al.*, 1999b). En la misma línea, la eliminación de los macrófagos conlleva a la reducción de la respuesta Th1 y el aumento de la respuesta de tipo Th2 (Jun *et al.*, 1999a). Por otra parte, la secreción de mediadores inflamatorios constituye una función efectora directa de este tipo celular. Se ha descrito que los macrófagos secretan diferentes moléculas pro-inflamatorias, entre las cuales se encuentran citocinas, como IL-1 β o TNF α , y radicales libres (Amush *et al.*, 1998; Dahlén *et al.*, 1998; Stoffels *et al.*, 2004; Uno *et al.*, 2007). Todo ello contribuye al desarrollo patológico de la T1D.

Otras células del SI innato también se han relacionado con el desarrollo patológico de esta enfermedad, tales como las **DCs**. Se ha descrito que estas células se encuentran localizadas alrededor de los islotes pancreáticos en pacientes con T1D, por lo que se ha sugerido que la destrucción de las células β pancreáticas puede ser facilitada, directa o indirectamente, por las DCs que han migrado al interior del órgano (Summers *et al.*, 2003b). Sin embargo, otras investigaciones han mostrado que el número de DCs circulantes se encuentra reducido (Vuckovic *et al.*, 2007). Uno de sus mecanismos de acción puede ser la presentación antigénica. Estas células pueden capturar auto-antígenos liberados tras la muerte de las células β y presentarlos a las células T auto-reactivas, Th o CTL, en los nódulos linfáticos pancreáticos donde se inicia la respuesta diabetogénica (Calderon y Unanue, 2012). Además, las DCs producen citocinas tales como TNF α , lo que promueve la respuesta inflamatoria desarrollada en el páncreas (Dahlén *et al.*, 1998; Uno *et al.*, 2007).

Por otra parte, algunas evidencias sugieren un posible papel de las células **NK** en el desarrollo de la respuesta inflamatoria de la diabetes (Dotta *et al.*, 2008). La función de estas células en la T1D se ha estudiado extensamente, sin embargo los resultados no son unánimes. No obstante varios trabajos han mostrado que: estas células se encuentran en los infiltrados pancreáticos; su fenotipo está alterado; están involucradas en el desarrollo de la respuesta inmune a través de la secreción de IFN γ

entre otros mecanismos (Flodström *et al.*, 2002; Poirot *et al.*, 2004; Rodacki *et al.*, 2007; Dotta *et al.*, 2007; Alba *et al.*, 2008; Brauner *et al.*, 2010).

Sumado a la acción de las células de la inmunidad innata, tanto linfocitos T como los linfocitos B, activados frente a antígenos propios, desempeñan una función crucial en el desarrollo de esta enfermedad. Por una parte, los **linfocitos B** contribuyen activamente al desarrollo de la patogenia de la enfermedad (Wong y Wen, 2005; Mariño y Grey, 2008; Mallone y Brezar, 2011; van Belle *et al.*, 2011). Su implicación en la diabetes es tal que incluso en modelos animales se ha descrito que su presencia es necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Serreze *et al.*, 1996; Akashi *et al.*, 1997; Noorchashm *et al.*, 1997). Estas células se encargan de la producción de anticuerpos frente a los antígenos liberados por las células β pancreáticas. La presencia temprana de auto-anticuerpos indica una función de las células plasmáticas en el inicio de los eventos inmunológicos. Sin embargo, la función concreta de estos auto-anticuerpos no está muy definida. Por otro lado, la función crítica de las células B en el desarrollo patológico durante la fase posterior de la respuesta inmune se ha asociado a su capacidad de presentar antígenos diabetogénicos tanto a las células T colaboradoras como los CTL (Silveira y Grey, 2006; Mariño y Grey, 2008; Marleau *et al.*, 2008). Las células B captan auto-antígenos y se los presentan a las células Th, las cuales a su vez activan a las células T CD8, que también pueden ser activadas directamente a través de la presentación antigénica mediada por los linfocitos B. De manera que, las células B participan fuertemente promoviendo el desarrollo de la respuesta inmune patológica que da lugar a la enfermedad.

Por otra parte, los **linfocitos T** desempeñan una función clave en el proceso destructivo autoinmune que tiene lugar en la T1D (Piot *et al.*, 2008; Eizirik *et al.*, 2009; Lehuen *et al.*, 2010; van Belle *et al.*, 2011; Wållberg y Cooke, 2013; Szablewski, 2014). Ambos tipos de células T, CD4 y CD8, participan en la respuesta inmune desencadenada en la T1D, actuando al unísono en la activación de la apoptosis de las células β pancreáticas. En modelos animales se ha descrito que la función de estas células es primordial para el desarrollo patológico de la enfermedad, siendo necesaria la presencia de ambos tipos celulares para que tenga lugar la patología (Christianson *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 2009). En relación a los linfocitos **T CD4**, éstos desempeñan diversas funciones que promueven la respuesta inflamatoria de la T1D (véase *Bloque V. Aparatado 1.3*). Por su parte, los linfocitos **T CD8** presentan también una función clave en la destrucción células β pancreáticas, las cuales pueden ser destruidas directamente por estos linfocitos a través de procesos citotóxicos (Eizirik y Mandrup-Poulsen, 2001; Piot *et al.*, 2008; Eizirik *et al.*, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Szablewski, 2014). Estos linfocitos acuden a los islotes pancreáticos gracias a la secreción de citocinas secretadas que promueven su migración y allí se activan mediante la señalización mediada por la molécula MHC I, expresada en las células β pancreáticas (Serreze *et al.*, 1997; DiLorenzo *et al.*, 1998). Una vez activados en el páncreas conducen a la destrucción de las células β pancreáticas a través de la liberación de gránulos de perforina y GZMB o mediante la vía Fas/FasL (Eizirik y Mandrup-Poulsen, 2001).

2.1.2. Mediadores solubles en la diabetes autoinmune

Los mecanismos de destrucción de las células β pancreáticas que tienen lugar en la T1D dependen tanto de las interacciones celulares como de los mediadores solubles producidos por las células inmunes, así como por las propias células de los islotes. Estos mediadores, entre los que se encuentran anticuerpos, quimiocinas, citocinas y moléculas citotóxicas, desempeñan una función fundamental en el desencadenamiento, amplificación y mantenimiento de la respuesta inmune auto-reactiva propia de la T1D.

Los **auto-anticuerpos** dirigidos hacia las células de los islotes que reaccionan frente a antígenos localizados en el citoplasma de todas las células endocrinas de los islotes pancreáticos fueron los primeros en ser descritos (Bottazzo *et al.*, 1974). Los estudios posteriores han identificado numerosos auto-anticuerpos frente a distintas moléculas presentes en las células β pancreáticas, entre los que destacan los anticuerpos dirigidos contra la insulina, la enzima ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65, del inglés *Glutamic Acid Decarboxylase 65*), el antígeno 2 asociado a insulinoma (IA-2, del inglés *Islet Antigen-2*) y el transportador de zinc 8 (ZnT8, del inglés *Zinc Transporter 8*) (van Belle *et al.*, 2011; Szablewski *et al.*, 2014). Dado que la presencia de auto-anticuerpos precede a la clínica característica de la diabetes, ésta puede usarse como marcador predictivo de la enfermedad (Pihoker *et al.*, 2005; Zang y Eisenbarth 2011; Wenzlau y Hutton, 2013). En relación a la función patogénica, no se conoce completamente y además los auto-anticuerpos por sí solos no parecen ser suficientes para inducir la destrucción de las células β . Se ha descrito que los auto-anticuerpos modulan el procesamiento y la presentación antigénicos, siendo la respuesta de los linfocitos T mayor en su presencia (Pihoker *et al.*, 2005). No obstante, a pesar de que no se conoce su función exacta, ha sido muy bien definida su papel como biomarcadores de la enfermedad, lo cual tiene importantes implicaciones en el tratamiento de los pacientes con T1D.

Las **quimiocinas** son mediadores inflamatorios importantes implicados en el desarrollo de la respuesta inflamatoria que tiene lugar en los islotes pancreáticos (Christen, 2007; Rotondi *et al.*, 2007; Pirot *et al.*, 2008; Eizirik *et al.*, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Szablewski, 2014). Su expresión, así como la de sus receptores se encuentra alterada en la T1D (Eizirik *et al.*, 2009). El reclutamiento de las células inmunes al páncreas involucra la producción de varias quimiocinas por parte de las DCs, los macrófagos, los linfocitos Th, las células endoteliales y las propias células β pancreáticas. Entre las citocinas producidas se encuentran CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL12, CXCL1, CXCL10, CX3CL1 y XCL1. De modo que, las quimiocinas, al promover el reclutamiento a los islotes de las células inmunes, tales como los macrófagos y otros tipos celulares, contribuyen activamente al desarrollo de la insulitis en la T1D, fundamentalmente en los estadios tempranos de la enfermedad.

Por su parte, las **citocinas** también se encuentran fuertemente implicadas en los procesos de inflamación y destrucción que tiene lugar en la T1D (Eizirik y Mandrup-Poulsen, 2001; Cnop *et al.*, 2005; Pirot *et al.*, 2008; Eizirik *et al.*, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Szablewski, 2014). Se ha descrito

principalmente la función clave de tres citocinas: IFN γ , TNF α e IL-1 β . Las tres citocinas actúan en cooperación promoviendo la muerte de las células β pancreáticas a través de varios mecanismos (Eizirik y Mandrup-Poulsen, 2001; Cnop *et al.*, 2005; Pirot *et al.*, 2008). Por un lado, estas citocinas inducen la actividad de la enzima iNOS y, por tanto, promueven una producción masiva de ON. Este hecho conduce a la muerte de las células de los islotes, las cuales son especialmente sensibles a la acción de los radicales libres. Por otro lado, IL-1 β , TNF α e IFN γ también promueven la apoptosis de las células β pancreáticas mediante la expresión de Fas y FasL. De manera que, estos mediadores inflamatorios promueven activamente la destrucción de los islotes pancreáticos que tiene lugar en la T1D. Además de la importante participación de estas citocinas, existen otras interleucinas, como la IL-17 que promueven también el desarrollo de la enfermedad.



Finalmente, la producción de moléculas citotóxicas se encuentra fuertemente ligada a la destrucción de las células β pancreáticas (Thomas *et al.*, 2010). Los gránulos de **perforina** y **GZMB** median directamente la apoptosis de las células de los islotes (Kägi *et al.*, 1996; Kreuwel *et al.*, 1999; Kägi *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2004; Sutton *et al.*, 2006b). Por tanto, estos mediadores se encuentran involucrados en los estadios tardíos de la enfermedad, considerándose como efectores finales de la destrucción de los islotes pancreáticos.

2.2. MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL NOD

Existen varios modelos experimentales de T1D. Algunos de ellos desarrollan la diabetes autoinmune de forma inducida, a través de la exposición a toxinas o mediante infección vírica. Sin embargo, otros modelos son capaces de desarrollar T1D de forma espontánea, tales como el modelo de ratas denominado BB (del inglés *BioBreeding*) y el modelo de ratones diabéticos no obesos (NOD, del inglés *Non Obese Diabetic*).

El modelo NOD fue desarrollado en 1980 a partir de una cepa de ratones propensos a sufrir cataratas (Makino *et al.*, 1980). Su descubrimiento fortuito dio lugar a la generación del modelo animal más empleado para el estudio de la T1D. A pesar de las diferencias entre especies, este modelo presenta gran similitud con la patología humana por lo que su uso para el estudio de la T1D se ha generalizado (véase *Tabla 10*). Estos ratones presentan numerosas alteraciones genéticas que causan el desarrollo espontáneo de la autoinmunidad. Debido a las múltiples variaciones genéticas, además de desarrollar diabetes, muestran alteraciones en diversos tejidos, incluyendo varias glándulas (como las salivales, las lacrimales, la tiroides, la paratiroides y la adrenal), el intestino delgado, los testículos y los eritrocitos, lo que da lugar al desarrollo de otras respuestas autoinmunes espontáneas tales como sialitis o sialadenitis, tiroiditis, colitis, poli-neuropatía periférica autoinmune, lupus eritematoso sistémico y prostatitis. (Anderson y Bluestone, 2005; Aoki *et al.*, 2005).

Tabla 10. Características de la diabetes autoinmune en humanos y en ratones NOD.

Características	T1D Humanos 	Ratones NOD 
EDAD DE COMIENZO	Mayoritariamente diagnosticada en niños y adultos jóvenes.	12-30 semanas de edad.
ETIOLOGÍA		
✓ Asociación con MHC	Asociación a múltiples genes, especialmente los alelos MCH II DR/DQ y MHC I A/B.	Asociación a múltiples genes, especialmente los alelos MHC II I-A ^{g7} y MHC I K ^d /D ^b .
✓ Asociación con genes no MHC	> 50 genes	> 40 genes
PATOGENIA		
✓ Insulinitis	Mayoritariamente células T CD4, T CD8, B y macrófagos.	Mayoritariamente células T CD4, T CD8, B, DCs y macrófagos.
✓ Implicación de las células T en la insulinitis	Moderada.	Severa.
✓ Infiltrados linfoides en otros tejidos	Presentes en una minoría de los pacientes.	Presentes en todos los ratones.

Nota: Resumen de las principales similitudes y diferencias en el desarrollo de la diabetes autoinmune en humanos y en ratones NOD (Roep *et al.*, 2004; Thayer *et al.*, 2010; Driver *et al.*, 2012).

2.2.1. Etiología de la diabetes autoinmune en los ratones NOD

Paralelo a la T1D humana, se ha descrito que el desarrollo de la diabetes en el modelo NOD tiene un fuerte componente genético. Estos ratones presentan múltiples loci que controlan la susceptibilidad genética de la diabetes, los cuales se han denominado *Idd* (del inglés *Insulin-Dependent Diabetes*). La susceptibilidad de la enfermedad en estos ratones está fuertemente influenciada por una compleja red de modificaciones genéticas, ya que se han descrito múltiples regiones *Idd* y además la mayoría de ellas contiene varios genes. (Aoki *et al.*, 2005; Driver *et al.*, 2011; Driver *et al.*, 2012).

El loci *Idd1*, que codifica para la región MHC II, muestra la mayor asociación genética descrita. Concretamente, la susceptibilidad genética viene marcada por el haplotipo I-A^{g7}, para el cual los ratones NOD son homocigotos. I-A^{g7} tiene la capacidad de presentar antígenos propios y péptidos promiscuos (Stratmann *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2005; Driver *et al.*, 2011). El complejo resultante de la unión de I-A^{g7} al péptido es inestable y se caracteriza por una escasa capacidad para estimular a los linfocitos T (Carrasco-Marin *et al.*, 1996; Hausaman *et al.*, 1999), lo que se ha relacionado con la generación del diverso repertorio de células T auto-reactivas (Kanagawa *et al.*, 1998; Ridgway *et al.*, 1998).

También se ha mostrado que la región MHC I también contribuye a la susceptibilidad a padecer diabetes en el modelo NOD (Serreze *et al.*, 1997). Además muchos otros genes están asociados con tal susceptibilidad (Anderson y Bluestone, 2005; Driver *et al.*, 2011). Entre ellos destaca la región

denominada *Idd3*, dentro de la cual se encuentran los genes *IL-2* e *IL-21* (Prochazka *et al.*, 1987; McGuire *et al.*, 2009). Otra región con una fuerte asociación a la T1D es *Idd5.1*, en la que se encuentra el gen *Ctla-4* (Hill *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2003; Vijaykrishnan *et al.*, 2004; Araki *et al.*, 2009). Estos y otros genes contribuyen en mayor o menor medida en el desarrollo de la respuesta inflamatoria que conduce a la diabetes.

2.2.2. Desarrollo de la diabetes autoinmune en los ratones NOD

Similar a la T1D en humanos, los ratones NOD presentan síntomas tales como hiperglucemia, glucosuria, poliuria, polidipsia e hipercolesterolemia. Estos ratones inicialmente desarrollan una infiltración leucocitaria alrededor de los islotes pancreáticos (peri-insulitis) hacia la semana 3-5 de edad. Durante las siguientes semanas, los infiltrados progresan e invaden los islotes pancreáticos (insulitis), mostrándose una insulitis severa en la semana 10 en la mayoría de los ratones. La diabetes manifiesta ocurre entre las 12 y 14 semanas de edad en las hembras y un poco después en los machos. En este momento la mayoría de las células β pancreáticas se han destruido y la homeostasis de la glucosa se ve afectada en todo el organismo, lo que se traduce en toda la serie de manifestaciones sintomáticas que en su conjunto caracterizan a la diabetes. (Anderson y Bluestone, 2005; Driver *et al.*, 2011).

Los infiltrados celulares que se desarrollan en los islotes pancreáticos contienen mayoritariamente células Th, pero también linfocitos T citotóxicos, linfocitos B, DCs y macrófagos, entre otros tipos celulares. De modo que el desarrollo patológico de la enfermedad en estos ratones involucra tanto a las células del SI innato como del adaptativo. En relación a las células de la inmunidad innata, destaca su función como APCs, la cual se encuentra alterada. Debido a las alteraciones genéticas que presentan estos ratones, los mecanismos de tolerancia central y periférica mediados por la presentación antigénica son defectuosos (Rosmalen *et al.*, 2002; Anderson y Bluestone, 2005; Aoki *et al.*, 2005; Driver *et al.*, 2011). El deterioro de los mecanismos de inducción de tolerancia se produce dado que los ratones NOD presentan alteraciones tanto en el desarrollo como en la función en las APC, por lo que estas células no causan la estimulación fuerte necesaria para inducir la eliminación de las células T auto-reactivas (Serreze *et al.*, 1993a). Junto con las alteraciones en la presentación antigénica, existe un déficit en la co-estimulación de forma generalizada en estos ratones, observándose una expresión alterada de diferentes moléculas co-estimuladoras, tales como CD86, CTLA-4, la proteína inducible co-estimuladora de células T (ICOS, del inglés *Inducible T cell COStimulator*) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1, del inglés *Programmed cell Death 1*) (Anderson y Bluestone, 2005; Aoki *et al.*, 2005). Puesto que esta expresión es defectuosa, las células T auto-reactivas no reciben la suficiente señal co-estimuladora dando lugar a un defecto en los procesos de selección tímica y, por tanto, promoviendo la autoinmunidad.

Los **macrófagos** de estos ratones se caracterizan por presentar defectos en ambos aspectos, desarrollo y funcionalidad, lo que contribuye al progreso de la T1D (Serreze *et al.*, 1993a; Serreze *et al.*,

1993b). Ya que su función presentadora es defectuosa, los mecanismos de regulación que implican la función macrofágica se encuentran alterados (Serreze *et al.*, 1993a). Además de su defecto en la presentación antigénica, se han descrito diversas funciones de los macrófagos involucradas en el desarrollo de la diabetes, entre ellas la generación y la activación de los CTLs y la modulación de la respuesta de los linfocitos Th (Jun *et al.*, 1999a; Jun *et al.*, 1999b). También, se ha mostrado que los macrófagos de los ratones NOD son ineficaces en la fagocitosis de las células apoptóticas (O'Brien *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2006). Además, producen altas cantidades de mediadores inflamatorios, como IL-1 β , TNF α , GM-CSF y PGE2 (Stoffels *et al.*, 2004; Litherland *et al.*, 2005). Todo ello participa en la generación de un microambiente inflamatorio crónico que contribuye al desarrollo de la diabetes.

De modo similar a los macrófagos, la diferenciación y la función de las DCs también se encuentran alteradas, lo que contribuye al desarrollo patológico de los ratones NOD. Estas células, defectuosas en su maduración, muestran una baja expresión de las moléculas de presentación antigénica y las moléculas co-estimuladoras, generando un déficit en la eliminación de las células T auto-reactivas (Lee *et al.*, 2000; Strid *et al.*, 2001; Boudaly *et al.*, 2002).

En los ratones NOD, además de la contribución de las células del SI innato a la patogénesis de la enfermedad, se ha definido una función clave de las **células T**. Numerosas evidencias apoyan la implicación de los linfocitos T, Th y T citotóxicos, fundamentalmente agrupadas en dos hechos clave:

- ❖ Las células T CD4 y T CD8 procedentes de donantes NOD muestran la habilidad de transferir la enfermedad en ratones NOD pre-diabéticos, mientras que los auto-anticuerpos no transfieren la enfermedad (Wicker *et al.*, 1986; Bendelac *et al.*, 1987; Bendelac *et al.*, 1998; Christianson *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1996)
- ❖ Las terapias que modulan las células T inhiben la incidencia de la enfermedad (Mori *et al.*, 1986; Shizuru *et al.*, 1988; Kurasawa *et al.*, 1993; Chatenoud *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2014).

Aunque se ha destacado especialmente la función de las células T CD4, se ha descrito que el desarrollo de la T1D en estos ratones requiere ambos tipos de linfocitos, Th y T citotóxicos (Christianson *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 2009). Se cree que las células T CD8 presentan una función importante en el desarrollo temprano de la enfermedad (Wang *et al.*, 1996), mientras que los linfocitos T CD4 son importantes tanto al inicio como en la fase avanzada de la misma (Aoki *et al.*, 2005). Ambos tipos de linfocitos muestran capacidad para responder frente a antígenos propios. Otra de las explicaciones sobre la aparición de células T auto-reactivas se basa en el hecho de que estos linfocitos T diabéticos muestran defectos en su capacidad para responder a las señales de activación que desencadenan vías apoptóticas (Rapoport *et al.*, 1993a; Arreaza *et al.*, 2003; Decallonne *et al.*, 2003; Liston *et al.*, 2004; Zucchelli *et al.*, 2005). De manera que, la alteración en los mecanismos apoptóticos de las células T, sumado a los defectos anteriormente descritos en las APCs, permiten la aparición de clones con especificidad frente a células β pancreáticas en periferia.

Además de las células T efectoras, se ha descrito también que el trastorno en la funcionalidad de las células Treg contribuye a la patogénesis de la enfermedad en los ratones NOD (Anderson y Bluestone, 2005; Aoki *et al.*, 2005; Driver *et al.*, 2011). Aunque algunas investigaciones apuntan hacia un menor número de células Treg (Salomon *et al.*, 2000; Nti *et al.*, 2012), otros trabajos indican que el déficit en la función T reguladora no es cuantitativo sino cualitativo, mostrándose una capacidad supresora disminuida, la cual varía durante la evolución de la enfermedad (Gregg *et al.*, 2004; You *et al.*, 2005; Mellanby *et al.*, 2007; Tritt *et al.*, 2008).

Por su parte, como se menciona anteriormente, los **linfocitos B** también contribuyen significativamente a la diabetes (Serreze *et al.*, 1996; Akashi *et al.*, 1997; Noorchashm *et al.*, 1997). Similar a la T1D en humanos, estas células producen auto-anticuerpos que preceden al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, además de la producción de anticuerpos, los linfocitos B presentan también una importante función como APCs. Se ha descrito que su función en la presentación antigénica es clave en la expansión de células T CD4 auto-reactivas (Falcone *et al.*, 1998; Serreze *et al.*, 1998; Greeley *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2006). Además, los linfocitos B contribuyen al desarrollo de la diabetes a través del mantenimiento de estructuras linfoides ectópicas que surgen en el páncreas (Luther *et al.*, 2000), las cuales contribuyen al reclutamiento y la activación de las células Th en los islotes (Wu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006).

Pese a las diferencias, este modelo se ha considerado de gran utilidad para el estudio de la patogenia de la T1D. El análisis de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad en estos ratones ha aportado gran cantidad de información útil para la patología humana, destacando la implicación de las células Th en la patogenia de la T1D.

2.3. DIABETES AUTOINMUNE Y LINFOCITOS T COLABORADORES

Los linfocitos T colaboradores desempeñan una función crucial en el desarrollo de la T1D. Existen numerosas evidencias que resaltan la importante función de estas células en la patogenia de la enfermedad (Faustman y Davis, 2009; Lehuen *et al.*, 2010; Wållberg y Cooke, 2013):

- ❖ Las células T CD4 presentan una función esencial en el desarrollo de la enfermedad en modelos animales de diabetes autoinmune, como el modelo NOD.
- ❖ La región genética más fuertemente asociada al riesgo de padecer diabetes es la región MHC II, relacionada específicamente con la activación de los linfocitos Th.
- ❖ Las células Th están implicadas en la autoinmunidad propia de esta enfermedad ya que presentan una función colaboradora con los linfocitos B en la producción de inmunoglobulinas.
- ❖ Los infiltrados celulares pancreáticos presentan células T CD4, tanto en modelos animales como en pacientes con T1D.
- ❖ La eliminación de las células Th en ratones NOD decrece la incidencia de la enfermedad y puede revertir el comienzo de la misma.

- ❖ Las terapias dirigidas frente las células T dan lugar a una supresión de la destrucción de las células β pancreáticas.

El análisis inicial de la implicación de las subpoblaciones Th en la T1D se realizó en el marco del paradigma Th1/Th2. En este sentido, se observó que en modelos experimentales el perfil de citocinas estaba asociado al subconjunto Th1, con una aumentada producción de IFN γ y una disminución en la producción de IL-4 (Huang *et al.*, 1995; Bernan *et al.*, 1996; Koarada *et al.*, 2002). De tal modo que primeramente se consideró que la respuesta de tipo Th1 estaba asociada a la progresión de la enfermedad y la de tipo Th2 era capaz de suprimir el desarrollo de la misma (Sarvetnick *et al.*, 1990; Hancock *et al.*, 1995; Faust *et al.* 1996; Fox y Danska, 1997; Hill *et al.*, 2003). Diversos estudios demostraron que la inducción de la respuesta Th1 promueve el desarrollo de la enfermedad, mientras que la inhibición de tal respuesta bloquea la incidencia de la diabetes. Así, por ejemplo, se describió que la IL-12, un inductor de la generación de linfocitos Th1, acelera la enfermedad en los ratones NOD, mientras que su bloqueo la inhibe (Trembleau *et al.*, 1995; Trembleau *et al.*, 1997; Trembleau *et al.*, 2003). Contrariamente, se mostró que la administración exógena o la sobre-expresión en los islotes pancreáticos de IL-4 u otras citocinas asociadas al subtipo Th2 ayuda a proteger del desarrollo de la enfermedad (Rapoport *et al.* 1993b; Hancock *et al.*, 1995; Faust *et al.* 1996; Hill *et al.*, 2003). Sin embargo, las funciones inicialmente descritas para ambas subpoblaciones como patogénica (Th1) y protectora (Th2), fueron discutidas en base a otros hallazgos. Uno de ellos mostró que los ratones deficientes para IL-12 eran capaces de desarrollar diabetes normalmente (Trembleau *et al.*, 1999). Por otra parte, los ratones deficientes en IL-4 no presentaban una mayor incidencia de la enfermedad (Wang *et al.*, 1998). Además, en ratones NOD se describió que las células Th2 pueden causar diabetes (Pakala *et al.*, 1997). Por tanto, se demostró que ambas subpoblaciones están involucradas en el desarrollo patológico de la enfermedad (Almawi *et al.*, 1999; Azar *et al.*, 1999). Posteriormente, se ha sugerido que el balance entre ambos subtipos varía a lo largo de la enfermedad, mostrándose un predominio de la respuesta de tipo Th2 (insulitis no destructiva) durante la primera etapa y un aumento de la respuesta de tipo Th1 (insulitis destructiva) en una fase más avanzada de la enfermedad (Schloot *et al.*, 2002).

Las células **Th1** presentan una función importante en la patología de la T1D, fundamentalmente a través de la secreción de citocinas, mostrando efectos tanto directos como indirectos. Los linfocitos Th1 secretan varias citocinas, fundamentalmente IFN γ , el cual es un medidor clave en respuesta inmune desencadenada frente a las células β pancreáticas (Sarvetnick *et al.*, 1990). También de forma directa estas células actúan promoviendo la activación de los CTLs y los macrófagos lo que conduce al aumento de la liberación de mediadores citotóxicos y de la destrucción de las células de los islotes (Azar *et al.*, 1999; Wong y Janeway, 1999). Además, gracias a la secreción de IFN γ , los linfocitos Th1 inducen la infiltración celular en los islotes, promoviendo así la insulitis (Hill *et al.*, 2003). Otra citocina fuertemente asociada con las células Th1, es la IL-12, la cual también se ha visto involucrada con la patología de la T1D (Rothe *et al.*, 1996; Trembleau *et al.*, 1995; Alleva *et al.*, 2000; Nitta *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001). Esta citocina, junto con el propio IFN γ , promueve la expansión de estos linfocitos potenciando aún más la insulitis. Sumado a lo anteriormente descrito, de forma indirecta, los linfocitos

Th1 promueven el desarrollo de la T1D mediante diversos mecanismos, como la supresión de antagonistas naturales como IL-1Ra y el aumento de la producción de IL-1 β por parte de los macrófagos (Faust *et al.*, 1996). Todo ello lleva a una cascada de amplificación de la destrucción de las células β pancreáticas.

Por su parte, la función patogénica de las células **Th2** en la T1D se desarrolla a través de la secreción de citocinas, como la IL-4 (Tominaga *et al.*, 1998; Falcone *et al.*, 2001; Horiki *et al.*, 2003). Sin embargo, numerosos estudios muestran un efecto protector de esta citocina a través de diversas estrategias terapéuticas en modelos de diabetes experimental (Cameron *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2001; Zipris y Karnieli, 2002; Feili-Hariri *et al.*, 2003; Creusot *et al.*, 2008; Rehman *et al.*, 2008; Ruffner y Robbins, 2010; Mandke y Singh, 2012). Paralelamente, otras citocinas propias de esta subpoblación linfoide presentan también efectos beneficiosos en la enfermedad, tales como la IL-13 (Zaccone *et al.*, 1999; Kretowski *et al.*, 2000; Luopajarvi *et al.*, 2007; Rasche *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2013). Finalmente, otra citocina que presenta efectos beneficiosos en la T1D es la IL-25 (Emamaulle *et al.*, 2009). De tal modo que, a pesar de la diversidad de hallazgos, de forma más generalizada se ha observado un efecto protector de la subpoblación Th2 en relación al desarrollo de la T1D.

Otra subpoblación Th relacionada con esta enfermedad, la constituyen los linfocitos **Treg** (Bluestone *et al.*, 2008; Askenasy y Askenasy, 2013; Wållberg y Cooke, 2013). Por su función inmunomoduladora, estas células presentan funciones reguladoras y beneficiosas en la patogenia de la enfermedad, sin embargo los hallazgos al respecto de su presencia y funcionalidad no son unánimes. No obstante, se ha descrito que la existencia de un tiempo prolongado entre el comienzo de la respuesta inmune auto-reactiva y el desarrollo de la insulitis sugiere que hay un mecanismo fuerte de inmunoregulación, a pesar de que finalmente no sea capaz de evitar el desarrollo de la enfermedad (Bluestone *et al.*, 2008; Askenasy y Askenasy, 2013; Wållberg y Cooke, 2013). El efecto beneficioso sobre la T1D se ha comprobado en diversos estudios realizados en modelos animales en los que se ha observado que: estas células se encuentran en los islotes pancreáticos, presentan capacidad supresora, y que la transferencia de las misma inhibe la insulitis (Sakaguchi *et al.*, 1995; Lepault y Gagnerault, 2000; Tarbell *et al.*, 2001; Szanya *et al.*, 2002; Alyanakian *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004; You *et al.*, 2005; Masteller *et al.*, 2005). Este efecto inmunomodulador se ha descrito también en experimentos en los que existe una menor presencia de las células Treg o éstas son eliminadas o bloqueadas, ya que en ellos se observa que se produce un incremento en el desarrollo de la enfermedad, destacando así la importancia de su funcionalidad en la T1D (Salomon *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Mellanby *et al.*, 2007; Feurer *et al.*, 2009). Sin embargo, otros autores muestran que existe un defecto en la funcionalidad de estas células, mostrándose una reducción en su capacidad supresora en modelos animales de T1D (Gregg *et al.*, 2004; You *et al.*, 2005; Mellanby *et al.*, 2007; Tritt *et al.*, 2008). Paralelamente, algunas investigaciones sobre pacientes diabéticos han mostrado un defecto en la funcionalidad de las células Treg (Brusko *et al.*, 2005; Lindley *et al.*, 2005; Brusko y Atkinson, 2007; Haseda *et al.*, 2013). Además, se ha descrito la existencia de una mayor apoptosis en las células Treg de pacientes diabéticos (Glisic-Milosavljevic *et al.*, 2007). Sin embargo, el defecto funcional de las células

Treg no ha sido evidenciado de forma generalizada y se ha postulado que el déficit en los mecanismos de supresión de las células T autoreactivas se debe más a un fallo en la respuesta de estas células a la supresión que a un defecto intrínseco en las células Treg (Bluestone *et al.*, 2008; Askenasy y Askenasy, 2013; Wållberg y Cooke, 2013).

Además de estas subpoblaciones Th, otros subtipos posteriormente descritos se han relacionado con el desarrollo de la T1D. En este sentido diversas investigaciones han puesto en evidencia la función de las células **Th17** en la promoción de la patogenia de esta enfermedad (véase *Bloque V. Apartado 3.1*). Además, recientemente, se ha descrito la asociación entre las células **Th22** y la T1D (Xu *et al.*, 2014).

En resumen, las diferentes subpoblaciones linfoides presentan funciones clave en la patogenia de la T1D. Dado que algunas de ellas se han descrito recientemente, el estudio de sus implicaciones en esta enfermedad continúa en investigación, lo cual puede resultar en importantes hallazgos en relación al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

2.4. TRATAMIENTO DE LA DIABETES AUTOINMUNE

El tratamiento de la diabetes autoinmune tiene como finalidad paliar los efectos de la hiperglucemia causada por el déficit de insulina. Para ejercer el control metabólico el objetivo primordial es el **restablecimiento** de la **insulina** deficitaria, por lo que los pacientes son tratados con insulina exógena.

Los individuos que presentan un alto riesgo de padecer la enfermedad son sometidos a **tratamientos preventivos** que se pueden clasificar dentro de dos áreas, prevención primaria y secundaria. La prevención primaria es el tratamiento de los individuos con un riesgo genético incrementado e incluye la administración de suplementos nutricionales como la leche de vaca hidrolizada o la suplementación con vitamina D₃. Por su parte, la prevención secundaria se realiza en individuos con presencia persistente de auto-anticuerpos e involucra, entre otros, la administración de fármacos inmunosupresores. (Staeva-Vieria *et al.*, 2007; van Belle *et al.*, 2011; Brooks-Worrell y Palmer, 2013; Wu *et al.*, 2013; Szablewski, 2014).

El tratamiento de la T1D puede suponer el empleo de medicamentos de uso general entre los que se incluyen **fármacos inmunosupresores**, como la ciclosporina y **fármacos anti-inflamatorios**, como los anticuerpos anti-TNF α y anti-IL-1 β , entre otros. Estos fármacos tienen por objeto inhibir de forma generalizada la respuesta inmunológica en los pacientes.

Además del TNF α y la IL-1 β , otras muchas dianas biológicas presentan una finalidad terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad. Tales dianas se encuentran en el marco de dos tipos de terapias que también pueden emplearse también como tratamiento preventivo: las que van dirigidas frente a respuestas auto-reactivas específicas y las que no presentan especificidad antigénica.

Las **terapias antígeno-específicas** se basan en la administración de autoantígenos de las células β y buscan prevenir la respuesta autoinmune específica mediante la inducción de la respuesta T reguladora o la inhibición de las células T patogénicas (Tian y Kaufman, 2009; van Belle *et al.*, 2011; Staeva *et al.*, 2013). Tales terapias están ampliamente desarrolladas y han dado lugar a la realización de numerosos ensayos clínicos, destacando aquellos que implican la administración de insulina (Staeva-Vieria *et al.*, 2007; Culina *et al.*, 2013; von Herrath *et al.*, 2013).

Por su parte, las **terapias no antígeno-específicas** presentan numerosas dianas terapéuticas. De forma resumida, las diversas terapias se basan, entre otros mecanismos, en la promoción de la respuesta T reguladora, el bloqueo de la respuesta de los linfocitos T, la inhibición de la respuesta de las células B, el aumento de los niveles de DCs, el bloqueo de la señalización mediada por citocinas y el bloqueo de la co-estimulación, para cada uno de los cuales se han desarrollado diversas aproximaciones (Staeva-Vieria *et al.*, 2007; von Herrath *et al.*, 2013; van Belle *et al.*, 2011; Staeva-Vieria *et al.*, 2013; Brooks-Worrell y Palmer, 2013; Nepom *et al.*, 2013).

Otro tipo de terapias implican el **reemplazamiento** de las **células β pancreáticas**. Estas terapias incluyen tratamientos que promueven la secreción de insulina, neogénesis de células β pancreáticas, regeneración de los islotes pancreáticos, trasplante de páncreas o de islotes y terapias basadas en células madre (Skyler y Ricordi, 2011; van Belle *et al.*, 2011; Bruni *et al.*, 2014; Szablewski, 2014).

A pesar de todos los esfuerzos logrados, las terapias empleadas hasta el momento no consiguen una eficacia completa. Para aumentar la efectividad de los tratamientos se emplean también terapias combinadas en las que se utilizan distintas estrategias terapéuticas, como por ejemplo el bloqueo de la respuesta inmune sumado a la inducción de la regeneración de las células β pancreáticas. (Staeva-Vieria *et al.*, 2007; von Herrath *et al.*, 2013; van Belle *et al.*, 2011; Staeva-Vieria *et al.*, 2013). No obstante, en la actualidad existen numerosas áreas de investigación al respecto del tratamiento de esta enfermedad, siendo el diseño de nuevas dianas terapéuticas un objetivo primordial en este sentido.

3. LINFOCITOS Th17, INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD

Desde su descubrimiento, las células Th17 se han asociado con la patogénesis de múltiples enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Conocidas las propiedades inflamatorias de la IL-17, numerosas investigaciones, tanto en humanos como en modelos animales, han mostrado la asociación entre la citocina y los procesos inflamatorios y autoinmunes desencadenados en estas enfermedades. Así, se ha descrito la asociación de las células Th17 con patologías como AR, psoriasis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, T1D y asma, entre otras.

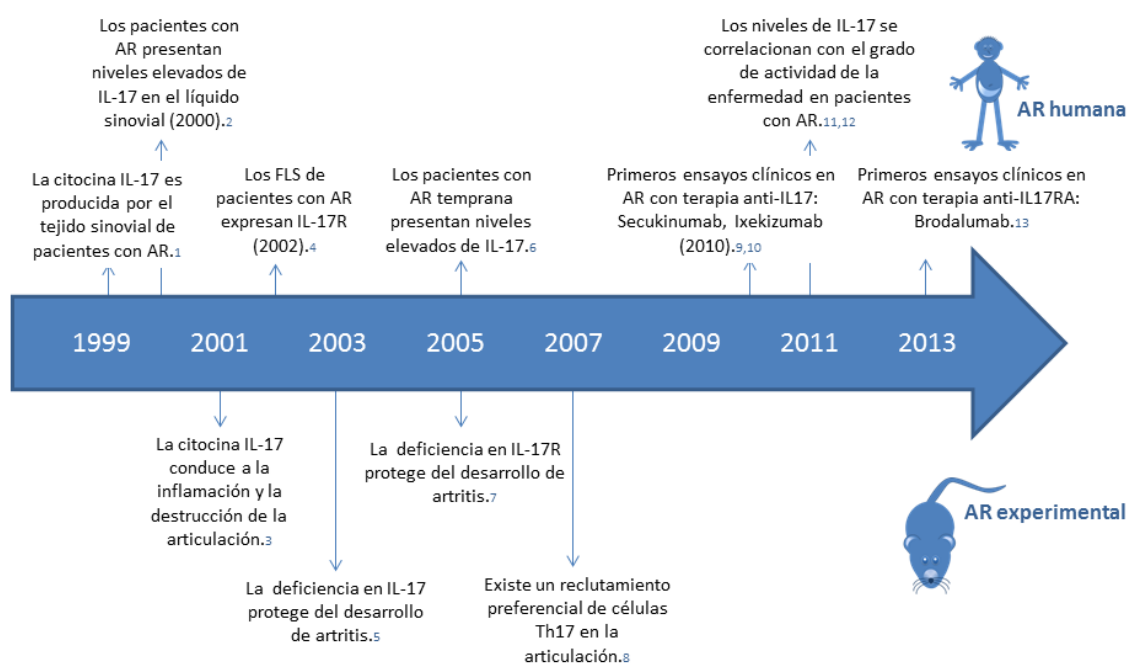
3.1. LINFOCITOS Th17 Y ARTRITIS REUMATOIDE

Las células Th17 desempeñan una función crítica en la patología de la AR, tanto en el desarrollo de la sinovitis como en la destrucción del cartílago y el hueso articulares. Su implicación en la patología de esta enfermedad se ha demostrado ampliamente en numerosas investigaciones

realizadas en modelos experimentales (véase *Figura 29*) (Lubberts *et al.*, 2005; Koenders *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2009; van den Berg, 2009). De manera general, en ellos se ha mostrado que:

- ❖ Existe un reclutamiento preferencial de células Th17 en las articulaciones inflamadas de ratones artríticos (Hirota *et al.*, 2007a).
- ❖ Las células Th17 y la IL-17 están implicadas en el desarrollo de artritis (Lubberts *et al.*, 2001; Lubberts *et al.*, 2002; Lubberts *et al.*, 2003; Nakae *et al.*, 2003a; Koenders *et al.*, 2005a; Hirota *et al.*, 2007b; Koenders *et al.*, 2008).
- ❖ La deficiencia de IL-17 o IL-17R en los ratones artríticos conlleva la supresión de la inducción de la enfermedad (Nakae *et al.*, 2002; Nakae *et al.*, 2003b; Koenders *et al.*, 2005b; Lubberts *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2012).
- ❖ El bloqueo de IL-17 o IL-17R reduce la inflamación y la destrucción de la articulación (Lubberts *et al.*, 2001; Bush *et al.*, 2002; Lubberts *et al.*, 2004; Koenders *et al.*, 2005c; Plater-Zyberk *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2011; Hickman-Brecks *et al.*, 2011; Ishiguro *et al.*, 2011; Koenders *et al.*, 2012).

Figura 29. Principales hallazgos sobre la implicación de IL-17 en la AR.



Nota: Resumen de los principales hallazgos asociados a la implicación de la IL-17 en la AR tanto en humanos como en modelos animales. Modificado de Kellner, 2013. Referencias bibliográficas: ¹. Chabaud *et al.*, 1999; ². Ziolkowska *et al.*, 2000; ³. Lubberts *et al.*, 2001; ⁴. Kehlen *et al.*, 2002; ⁵. Nakae *et al.*, 2003b; ⁶. Raza *et al.*, 2005; ⁷. Koenders *et al.*, 2005b; ⁸. Hirota *et al.*, 2007; ⁹. Hueber *et al.*, 2010; ¹⁰. Genovese *et al.*, 2010; ¹¹. Metawi *et al.*, 2011; ¹². Zizzo *et al.*, 2011; ¹³. Martin *et al.*, 2013.

Todas estas evidencias han establecido claramente la patogenicidad de las células Th17 en modelos experimentales de AR. Sin embargo, su implicación concreta en la AR en humanos continúa en investigación. A pesar de ello, se han publicado diferentes hallazgos al respecto (véase *Figura 31*). Numerosas investigaciones muestran que los pacientes con AR presentan niveles elevados de células Th17 e IL-17 tanto en sangre periférica como en el líquido y el tejido sinoviales (Chabaud *et al.*, 1999; Kotake *et al.*, 1999; Ziolkowska *et al.*, 2000; Honorati *et al.*, 2001; Raza *et al.*, 2005; Shahrara *et al.*, 2008; Moran *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011c; Metawi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*,

2012a; Li *et al.*, 2013c). Además, experimentos *ex vivo* exponen que la IL-17 se produce espontáneamente por parte de los FLS procedentes de la membrana sinovial de pacientes con AR (Chabaud *et al.*, 1999). Abundantes trabajos muestran las múltiples funciones que esta citocina desarrolla promoviendo la inflamación y la degradación de la articulación (véase *Bloque V. Apartado 3.1.2.*). Paralelamente, también existe una elevada expresión de los receptores para esta citocina IL-17RA, IL-17RB e IL-17RC en las células inmunes y los sinoviocitos de las articulaciones afectadas de pacientes con AR (Honorati *et al.*, 2001; Kehlen *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2004; Hwang y Kim, 2005; Zrioual *et al.*, 2008). Finalmente, el grado de actividad de la enfermedad se ha correlacionado con los niveles de células Th17 e IL-17 en el suero y líquido sinovial de pacientes con AR (Raza *et al.*, 2005; Kirkham *et al.*, 2006; Moran *et al.*, 2009; Leipe *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011c; Metawi *et al.*, 2011; Zizzo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013b).

3.1.1. Generación y/o activación de los linfocitos Th17 en la artritis reumatoide

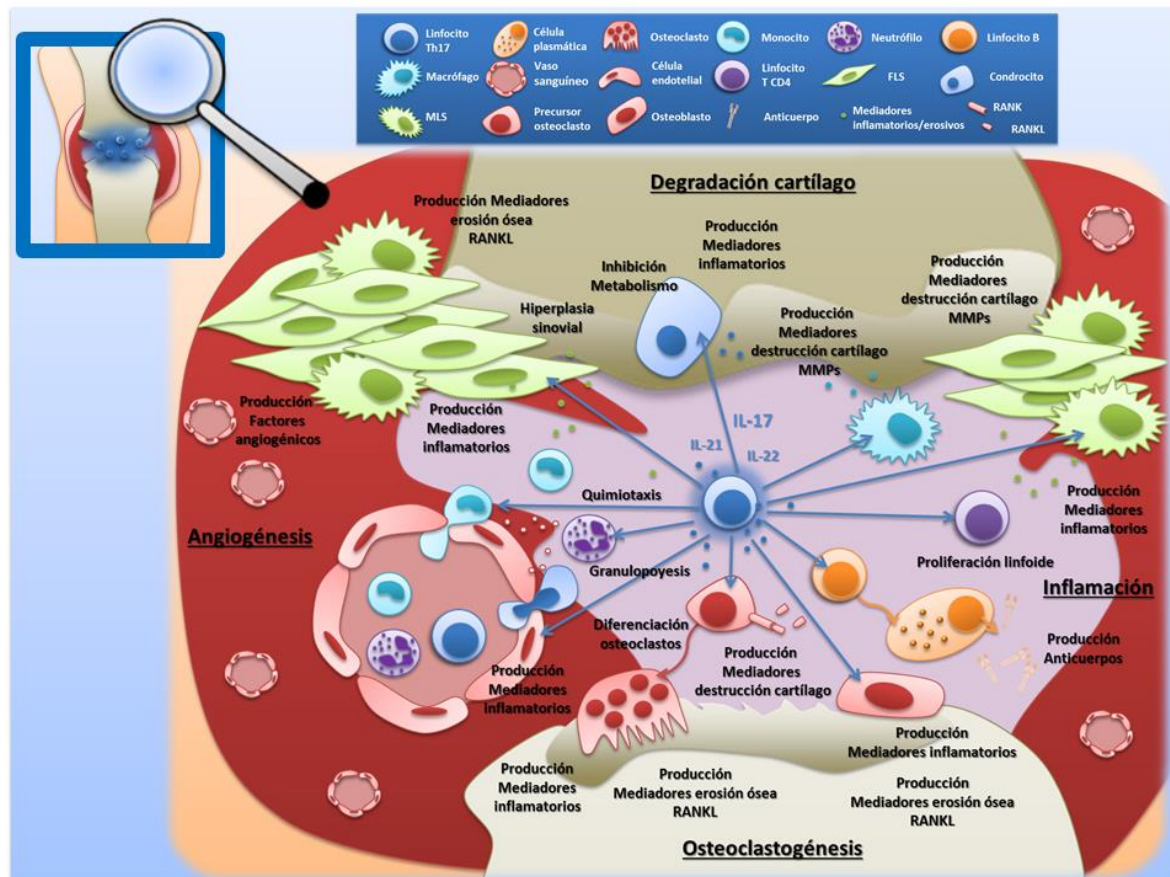
La generación y/o activación de las células Th17 en la AR se ha situado en el ambiente local de la articulación. A través de la participación de MLS, FLS y DCs, presentes en la articulación, se genera un ambiente local que promueve la respuesta Th17 (Hirota *et al.*, 2007b; Egan *et al.*, 2008; Dong y Zhu *et al.*, 2012). En el sinovium se produce una sobre-expresión de la producción de la quimiocina CCL20, la cual actúa como quimioatrayente, entre otras células, de los linfocitos Th17 (Matsui *et al.*, 2001; Hirota *et al.*, 2007a; van Hamburg *et al.*, 2011). Una vez que las células Th17 son atraídas a la articulación, el ambiente inflamatorio local, compuesto por mediadores pro-inflamatorios como IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-15 e IL-23, es el responsable del desarrollo y/o activación de las mismas (Dong y Zhu *et al.*, 2012). Las células Th17 a su vez son potenciadoras de su propio desarrollo en la articulación ya que establecen un bucle de retroalimentación positivo que favorece su auto-reclutamiento y activación. Esto tiene lugar puesto que la IL-17 induce en los FLS la producción de CCL20, favoreciendo así el reclutamiento de más células Th17 en el tejido sinovial reumatoide (Hirota *et al.*, 2007a; van Hamburg *et al.*, 2011). Además, sobre estas mismas células, la IL-17 potencia la expresión de altos niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-15 e IL-23, las cuales a su vez estimulan el desarrollo de los linfocitos Th17 (van Hamburg *et al.*, 2011). Sumado a ello, las citocinas pro-inflamatorias presentes en este ambiente local, como TNF α , promueven un aumento de la expresión de los receptores para la IL-17 (Carrión *et al.*, 2013), lo que potencia aún más la acción de los linfocitos Th17. De modo que, el ciclo de auto-activación produce una hiperactivación de las células Th17 en el sinovium, que da lugar a la potenciación del proceso inflamatorio y que culmina con la producción de erosiones en el cartílago y el hueso articulares.

3.1.2. Función de los linfocitos Th17 en la artritis reumatoide

Como se menciona anteriormente, la función de las células Th17 en la patogenia de la AR implica tanto la inflamación crónica como el daño en el cartílago y la erosión ósea (véase *Figura 30*). Esta amplia función la lleva a cabo mayoritariamente la IL-17 (véase *Tabla 11*) y tiene lugar ya que las

células Th17 promueven la activación tanto de células inmunes como de las células residentes en la membrana sinovial. Con respecto a estas últimas, son capaces de actuar sobre múltiples tipos celulares, incluyendo FLS, monocitos, MLS, células endoteliales, condrocitos, osteoblastos y osteoclastos, los cuales también están implicados en la patogénesis de la AR.

Figura 30. Función de las células Th17 en la artritis reumatoide.



Nota: Resumen de los principales factores y tipos celulares implicados en las funciones promovidas por las células Th17 durante la respuesta inflamatoria desencadenada en las articulaciones en la AR.

En relación a la **inflamación**, las células Th17 promueven, a múltiples niveles, el desarrollo de un proceso inflamatorio continuado en la articulación. La IL-17 induce sobre varios tipos celulares la liberación de diversos mediadores inflamatorios, como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y MMPs (Lubberts *et al.*, 2005a; Lubberts, 2008; Peck y Mellins, 2009; Sarkar *et al.*, 2010; Azizi *et al.*, 2013; Truchelet *et al.*, 2013; Benedetti y Miossec, 2014). A través de la producción de citocinas las células Th17 ejercen un potente efecto inflamatorio y gracias a la producción quimiocinas promueven el reclutamiento a la articulación de diferentes tipos celulares (neutrófilos, linfocitos T y B, monocitos, macrófagos). De todos ellos, los neutrófilos son el tipo celular más destacado. Sobre estas células, la IL-17 promueve su migración, supervivencia y función (Forlow *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2006; Parsonage *et al.*, 2008). Además, los linfocitos Th17 promueven también la proliferación de linfocitos T sinoviales a través de la secreción de IL-17 (Zhang *et al.*, 2013). Por otra parte, los linfocitos Th17 participan también en la respuesta humoral, promoviendo la producción de auto-anticuerpos (Hickman-Brecks *et al.*, 2011). Finalmente, estas células Th17 estimulan aún más la respuesta inflamatoria local al

promover la angiogénesis, fundamentalmente a través del aumento de la producción en los sinoviocitos del factor angiogénico VEGF (Honorati *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2006; Pickens *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013c). Subsecuentemente se favorece en mayor medida el reclutamiento de células inmunes lo que intensifica más la inflamación.

Tabla 11. Funciones principales de IL-17A en artritis reumatoide.

Célula diana		Referencias
Inflamación		
Inducción de la producción de mediadores pro-inflamatorios: ✓ Citocinas ej.: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-23, IL-16 ✓ Quimiocinas ej.: CCL2, CCL20, CXCL1, CXCL5, CXCL12, CXCL13 ✓ Factores de crecimiento ej.: G-CSF, GM-CSF ✓ Otros mediadores ej.: COX-2, ON, PGE2	FLS, MLS, condrocitos y osteoclastos.	Jovanovic <i>et al.</i> , 1998; Jovanovic <i>et al.</i> , 2000; Chabaud <i>et al.</i> , 2001a; Katz <i>et al.</i> , 2001; Kehlen <i>et al.</i> , 2002; Pacquelet <i>et al.</i> , 2002; Hwang <i>et al.</i> , 2004; Stamp <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2007a; Kim <i>et al.</i> , 2007b; Cho <i>et al.</i> , 2008; Takagi <i>et al.</i> 2008; Shahrara <i>et al.</i> , 2010; Moran <i>et al.</i> , 2011; van Hamburg <i>et al.</i> , 2011.
Inducción de la migración celular.	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y otros tipos celulares.	Jovanovic <i>et al.</i> , 2000; Forlow <i>et al.</i> , 2001; Kim <i>et al.</i> , 2007b; Takagi <i>et al.</i> 2008; Shahrara <i>et al.</i> , 2009; Shahrara <i>et al.</i> , 2010; Moran <i>et al.</i> , 2011; van Hamburg <i>et al.</i> , 2011.
Respuesta humoral		
Inducción de la producción de inmunoglobulinas.	Linfocitos B.	Hickman-Brecks <i>et al.</i> , 2011.
Hiperplasia sinovial		
Inducción de la hiperplasia sinovial: estimulación de la supervivencia y el comportamiento invasivo celular.	FLS.	Toh <i>et al.</i> , 2010; Park <i>et al.</i> , 2011; Hot <i>et al.</i> , 2012.
Angiogénesis		
Inducción de la liberación de factores angiogénicos como VEGF, KGF, HGF y HB-EGF.	FLS y otros tipos celulares.	Pacquelet <i>et al.</i> , 2002; Honorati <i>et al.</i> , 2006; Ryu <i>et al.</i> , 2006; Pickens <i>et al.</i> , 2010.
Dstrucción del cartílago		
✓ Inhibición de la síntesis de colágeno y proteoglicano mediante la producción de mediadores como ON. ✓ Inducción del catabolismo proteico mediante la producción de enzimas como MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9, MMP13).	Condrocitos, FLS, osteoclastos y monocitos/macrófagos	Chabaud <i>et al.</i> , 2000; Dudler <i>et al.</i> , 2000; Jovanovic <i>et al.</i> , 2000; Lubberts <i>et al.</i> , 2000; Cai <i>et al.</i> , 2001; Chabaud <i>et al.</i> , 2001b; Cai <i>et al.</i> , 2002; Koshy <i>et al.</i> , 2002; Van Bezooijen <i>et al.</i> , 2002; Pacquelet <i>et al.</i> , 2002; Sylvester <i>et al.</i> , 2004; Koenders <i>et al.</i> , 2005b; Moran <i>et al.</i> , 2009; van Hamburg <i>et al.</i> , 2011.
Erosión ósea		
Inducción de la osteoclastogénesis mediante la expresión de RANKL y otros mediadores de resorción ósea.	FLS, osteoblastos y otros tipos celulares.	Kotake <i>et al.</i> , 1999; Lubberts <i>et al.</i> , 2003; Page y Miossec, 2005; Sato <i>et al.</i> , 2006; Yago <i>et al.</i> , 2007; Hashizume <i>et al.</i> , 2008; Adamopoulos <i>et al.</i> , 2010.

Nota: Resumen de las principales funciones de la IL-17 sobre los diferentes tipos celulares involucrados en el proceso patológico de la AR.

Por otro lado, los linfocitos Th17 promueven la **hiperplasia sinovial**, favoreciendo tanto la supervivencia como la capacidad invasiva de los FLS. En primer lugar, en un modelo animal deficiente para IL-17RA, se observó que la señalización de la IL-17 es crítica para el desarrollo de la sinovitis destructiva ya que favorece la supervivencia de los sinoviocitos (Lubberts *et al.*, 2005b).

Posteriormente, se han descrito varios mecanismos anti-apoptóticos inducidos por esta citocina que promueven la hiperplasia sinovial. Uno de los mecanismos lo constituye el aumento de la expresión de sinoviocitos en los FLS inducido por la IL-17, lo que da lugar a una mayor supervivencia celular (Toh *et al.*, 2010). Otro mecanismo es la inducción de la expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2 en sinoviocitos de pacientes con AR (Lee *et al.*, 2013). Por otro lado, la IL-17 contribuye a la progresión de la artritis a través de la potenciación del comportamiento invasivo de los FLS (Hot *et al.*, 2012). Un ejemplo de ello es la inducción de la expresión de la molécula cadherina-11 (Park *et al.*, 2011), la cual está relacionada con el aumento de la conducta invasiva de los FLS (Lee *et al.*, 2007; Keiner *et al.*, 2009). Todo ello conduce a que, a través de la acción de los linfocitos Th17, se agrave el proceso inflamatorio y patológico desencadenado en la articulación.

Los linfocitos Th17 participan también en el proceso de la **destrucción del cartílago** que tiene lugar en la AR (Lubberts *et al.*, 2005a; Peck y Mellins, 2009; Li *et al.*, 2010; Hot y Miossec, 2011; Azizi *et al.*, 2013; Truchelet *et al.*, 2013). El proceso de degradación se encuentra fuertemente asociado a la inflamación, ya que muchos mediadores de la misma, como IL-1 β , IL-6, ON o COX-2, promueven también la pérdida del cartílago. A través de estos mediadores la IL-17 modula, de forma general, dos fenómenos sobre los condrocitos y los FLS. Por un lado inhibe la síntesis de matriz cartilaginosa y, por otro lado, promueve la degradación de la misma. En relación a la síntesis de matriz, la IL-17 es capaz de alterar el metabolismo de los condrocitos, inhibiéndose la síntesis de colágeno y proteoglicano, fundamentalmente mediante el aumento de la producción de ON (Lubberts *et al.*, 2000; Chabaud *et al.*, 2001b; Cai *et al.*, 2002; Pacquelet *et al.*, 2002; Van Bezooijen *et al.*, 2002). A su vez, esta citocina estimula el catabolismo proteico de la matriz mediante la inducción de enzimas de degradación, entre las que destacan las MMPs (Chabaud *et al.*, 2000; Dudler *et al.*, 2000; Jovanovic *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2001; Chabaud *et al.*, 2001b; Koshy *et al.*, 2002; Sylvester *et al.*, 2004; Koenders *et al.*, 2005b; Moran *et al.*, 2009; van Hamburg *et al.*, 2011).

Sumado a la destrucción del cartílago, los linfocitos Th17 también participan en el proceso de **erosión ósea** (Adamopoulos y Bowman, 2008; Sato, 2008; Braun y Zwerina, 2011; Okamoto y Takayanagi, 2011). Estas células destacan por ser las únicas células Th con propiedades osteoclastogénicas (Sato *et al.*, 2006). La IL-17 es un potente estimulador de la osteoclastogénesis (Kotake *et al.*, 1999). Esta citocina actúa a diferentes niveles, de forma directa e indirecta, promoviendo tanto la diferenciación como la actividad de los osteoclastos. Mayoritariamente, esta citocina ejerce su acción mediante la inducción de la expresión de RANKL sobre osteoblastos y fibroblastos (Lubberts *et al.*, 2003; Page y Miossec, 2005; Sato *et al.*, 2006). Además, las propias células Th17 expresan RANKL, sin embargo estudios *in vitro* muestran que esta expresión no es suficiente para inducir osteoclastogénesis en ausencia de RANKL exógeno (Sato *et al.*, 2006). Conjuntamente, la IL-17 induce la expresión del receptor activador de NF κ B (RANK, del inglés *Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa*) en precursores osteoclásticos, sensibilizándolos frente a la acción de este mediador osteoclastogénico (Adamopoulos *et al.*, 2010). Las células Th17 también promueven la expresión de otros mediadores de la degradación ósea, como la prostaglandina E2 (PGE2) (Kotake *et al.*, 1999).

Finalmente, mediante la inducción de la expresión de diversas citocinas inflamatorias, como IL-6, IL-1 β y TNF α , promueven también la resorción ósea, modulando el balance entre RANKL y osteoprotegerina (OPG) en osteoblastos y fibroblastos (Braun y Zwerina, 2011). Todo ello da lugar a una amplificación del efecto de las células Th17 sobre la erosión ósea.

Tal y como se describe para el caso de la resorción ósea, la IL-17 puede operar mediante mecanismos independientes de otras citocinas o de forma indirecta a través de la inducción de otras citocinas, como IL-1 β y TNF α . Aparte de estos dos mecanismos, la IL-17 actúa en combinación con estas citocinas. De hecho, muchas de las acciones anteriormente descritas se llevan a cabo en cooperación entre IL-17 e IL-1 β o entre IL-17 y TNF α . Esta acción aditiva o sinérgica le permite a la IL-17 desempeñar múltiples funciones. Por ejemplo, en sinergia con IL-1 β , aumenta la producción de mediadores inflamatorios como IL-6 (Chabaud *et al.*, 1998). Por otra parte, junto con TNF α , puede modular la expresión de numerosos mediadores del proceso inflamatorio y patológico como citocinas, MMPs, etc. (Goldberg *et al.*, 2009; Koenders *et al.*, 2011). De este modo, se ha propuesto que niveles bajos de citocinas producidos por los monocitos (IL-1 β o TNF α) y por las células Th17 (IL-17) pueden actuar juntos y promover el desarrollo patológico en la AR. Los mecanismos moleculares que dan lugar a la sinergia no se conocen con exactitud. Se ha sugerido como una posible explicación de la misma a través de la habilidad de la IL-17 para estabilizar post-transcripcionalmente el mRNA de otras citocinas como IL-1 β o TNF α (Benedetti y Miossec, 2014).

Además de la amplificación de la función de tipo Th17 por mecanismos sinérgicos, este subconjunto Th también promueve la respuesta inflamatoria y patológica en la AR a través de la secreción de IL-21 e IL-22. La citocina **IL-21** participa desencadenando y/o activando vías inflamatorias que promueven la inflamación y la destrucción de la articulación (Yuan *et al.*, 2011). Modelos animales de AR muestran que los ratones deficientes del receptor de IL-21 no desarrollan artritis espontánea (Jang *et al.*, 2009). En la misma línea, el bloqueo de la vía IL-21/IL-21R en artritis experimental da lugar a la inhibición de la progresión de la enfermedad (Young *et al.*, 2007). En humanos, la expresión de IL-21R se encuentra aumentada en linfocitos de sangre periférica y del líquido sinovial, así como en FLS y MLS de pacientes con AR (Jungel *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006a). Así mismo, también existe una elevada expresión de IL-21 en el tejido y el líquido sinoviales y en la sangre periférica de pacientes con AR (Niu *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2012). Además, hay una mayor frecuencia de células productoras de IL-21 en pacientes con AR crónica (Rasmussen *et al.*, 2010). Sumado a ello, los niveles de esta citocina se han correlacionado con el grado de actividad y la progresión radiológica de la enfermedad (Rasmussen *et al.*, 2010; Gottenberg *et al.*, 2012; Sglunda *et al.*, 2014). En la AR esta citocina regula diversas funciones. En primer lugar, la IL-21 induce la secreción de TNF α , IL-6, IFN γ e IL-1 β en sinoviocitos y linfocitos T de pacientes con AR (Li *et al.*, 2006a; Anderson *et al.*, 2008). La IL-21 media también la activación, proliferación y expansión de linfocitos T (Li *et al.*, 2006a; Young *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2009). Es destacable su función sobre la subpoblación linfoide Th17, ya que la IL-21 presenta una función autocrina sobre los linfocitos Th17 en los pacientes con AR (Niu *et al.*, 2010). También en la AR es importante su función sobre los linfocitos B. Esta citocina

promueve la respuesta humoral al inducir la diferenciación y expansión de las células B, así como la producción de citocinas y la formación de centros germinales (Jang *et al.*, 2009; Block *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha descrito una implicación de la IL-21 sobre el proceso de osteoclastogénesis que tiene lugar en la AR. Concretamente esta citocina induce la expresión de RANKL en células Th de ratones artríticos y en células Th y FLS pacientes con AR, promoviendo así la erosión ósea (Jang *et al.*, 2009; Kwok *et al.*, 2012). A pesar de que todas estas evidencias apuntan hacia una función pro-inflamatoria de la IL-21 en la AR, se ha sugerido que la acción de esta citocina podría ser dual, ya que ratones artríticos deficientes en IL-21R muestran una estimulación de la inflamación severa y la destrucción de la articulación, a la vez que un efecto protector durante la fase aguda de la artritis (Marjinissen *et al.*, 2014).

Por su parte, la expresión y función de la **IL-22** también se ha investigado en la AR. En artritis experimental, la IL-22 se encuentra expresada en el suero de ratones artríticos (Geobes *et al.*, 2009; Marjinissen *et al.*, 2011). Se ha descrito que, los ratones deficientes para esta citocina presentan una menor severidad en la enfermedad (Geobes *et al.*, 2009). En la misma línea, el bloqueo de la IL-22 reduce la inflamación y la erosión ósea en otro modelo animal de AR (Marjinissen *et al.*, 2011). En artritis experimental la principal fuente productora de IL-22 en el sinovium inflamado son las células T (Marjinissen *et al.*, 2011). En humanos, la IL-22 presenta niveles elevados en el tejido y el líquido sinoviales (Ikeuchi *et al.*, 2005), así como en el suero de pacientes con AR (Leipe *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; da Rocha *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a; Zhao *et al.*, 2013). Dentro del tejido sinovial, la IL-22 se expresa fundamentalmente en los FLS, aunque también en los MLS y en menor medida en los linfocitos T (Ikeuchi *et al.*, 2005). El receptor para esta citocina, IL-22R, se ha encontrado en niveles elevados en la membrana sinovial de pacientes con AR, fundamentalmente en los FLS (Ikeuchi *et al.*, 2005). La expresión de IL-22 e IL-22R en FLS procedentes de pacientes con AR es constitutiva, pero también inducible, ya que diferentes mediadores inflamatorios son capaces de incrementar la expresión del eje IL-22/IL-22R1 en los FLS (Carrión *et al.*, 2013). Sobre este tipo celular la IL-22 induce tanto la proliferación y la producción de mediadores inflamatorios (Ikeuchi *et al.*, 2005; Carrión *et al.*, 2013). Además, esta citocina promueve la osteoclastogénesis (Geobes *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). Concretamente los experimentos *in vitro* en AR han puesto de manifiesto que la IL-22 induce la expresión de RANKL en los FLS (Kim *et al.*, 2012). En paralelo con estos hallazgos, los niveles de IL-22 se han correlacionado con el grado de actividad de la enfermedad en pacientes con AR (Leipe *et al.*, 2011; da Rocha *et al.*, 2012). Así mismo, en artritis experimental los niveles de IL-22 e IL-22R también se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Marjinissen *et al.*, 2011). Todo ello sugiere que la IL-22 presenta un función patogénica en la AR. No obstante, como se menciona con anterioridad, a esta citocina se le han atribuido funciones tanto protectoras como pro-inflamatorias en diversas enfermedades. En esta línea, en AR también existen evidencias que muestran una función protectora de la IL-22 sobre el desarrollo de la enfermedad. Los experimentos anteriormente mencionados en el modelo de ratón deficiente para la IL-22 mostraron que, aunque la severidad de la enfermedad era menor, también lo era la incidencia de la misma (Geobes *et al.*, 2009). Lo cual, sumado a la alta

expresión de inmunoglobulinas que presentaban estos ratones, sugiere un efecto protector para la IL-22 (Geobes *et al.*, 2009). Además, en otro modelo murino de artritis se ha mostrado que la IL-22 reduce la severidad de enfermedad (Sarkar *et al.*, 2013). Este trabajo muestra que la administración de IL-22 retrasa la progresión de la artritis y que esta citocina induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, como la IL-10. Los autores postulan que el efecto de la IL-22 varía en las diferentes fases de la enfermedad. Paralelamente, se ha propuesto también que la función de la IL-22 es protectora previa al comienzo de la artritis y se convierte en patogénica en el ambiente inflamatorio artrítico (Justa *et al.*, 2014). En resumen, todos estos hallazgos sugieren un papel dual, protector y patogénico, de la IL-22 en el desarrollo de la AR.

Finalmente, diferentes **homólogos** de la **IL-17** también están implicados en la patogénesis de la AR. En pacientes con AR se ha detectado expresión de IL-17C, D y E en células mononucleares de líquido sinovial (Hwang y Kim, 2005) y de IL-17F en el tejido sinovial (Zrioual *et al.*, 2009). Relativo a su función en el desarrollo de la enfermedad, varios estudios proponen que estas citocinas están involucradas en la respuesta inflamatoria (Lubberts, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2007; Zrioual *et al.*, 2009; Hot y Miosec, 2011; Hot *et al.*, 2011). Así, por ejemplo, en CIA las citocinas IL-17B e IL-17C están implicadas en la inflamación articular a través de la inducción de la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-6, IL-23 e IL-1 β (Yamaguchi *et al.*, 2007).

En suma, las distintas moléculas efectoras secretadas, así como los múltiples mecanismos de acción involucrados en el proceso inmunológico y patológico desencadenado en la AR, hacen del subtipo Th17 un fuerte inductor de la inflamación y la destrucción articular en el AR. Este hecho puede verse aún más potenciado a través de los mecanismos de **plasticidad linfoide**. Así, la conversión de las células Th17 hacia el subtipo Th1 puede constituir un mecanismo agravante en esta enfermedad. En este sentido, en AR se han encontrado células co-expresoras de IL-17 e IFN γ (Colin *et al.*, 2010; van Hamburg *et al.*, 2011). Por otro lado, la plasticidad de las células Treg hacia el subtipo Th17 también puede ser un mecanismo potenciador de la patología. Varios estudios manifiestan la existencia de células co-expresoras de IL-17 e IL-10 o de RORC y Foxp3 en modelos experimentales y en pacientes con AR (Kong *et al.*, 2012; Afzali *et al.*, 2013; Guggino *et al.*, 2014; Komatsu *et al.*, 2014). En algunos de los ellos se ha descrito explícitamente esta conversión de células Treg en células Th17 (Kong *et al.*, 2012; Komatsu *et al.*, 2014). Estos fenómenos de plasticidad, todavía escasamente descritos en el caso de la AR, resaltan la importancia de continuar investigando en esta área con objeto de definir la estrategia terapéutica adecuada en cada fase de la enfermedad.

3.1.3. Linfocitos Th17 y tratamiento de la artritis reumatoide

La gran implicación de las células Th17 en la AR ha dado lugar a que esta subpoblación linfoide se postule como una diana terapéutica propicia para el tratamiento de esta enfermedad (Sarkar *et al.*, 2010; Kellner *et al.*, 2013). Numerosos trabajos muestran la eficacia de diversas estrategias terapéuticas sobre estas células en varios modelos animales. Así, por ejemplo, el bloqueo de la IL-17 en un modelo

de CIA da lugar a una reducción de la inflamación, la destrucción del cartílago y la erosión ósea (Lubberts *et al.*, 2004). En la misma línea, el empleo de un anticuerpo frente a IL-17R conlleva la atenuación clínica, radiológica e histológica de las manifestaciones de la enfermedad en el modelo AIA en rata (Bush *et al.*, 2002). Estas y muchas otras evidencias mostradas en modelos animales de AR han dado lugar al comienzo de las investigaciones sobre las células Th17 como diana terapéutica en la AR humana. En la actualidad, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas relacionadas con las células Th17 y la AR en humanos (véase *Tabla 12*). Las principales estrategias terapéuticas van dirigidas directamente frente a la IL-17. Se han realizado diferentes ensayos clínicos con dos anticuerpos frente a la IL-17 humana, el anticuerpo Secukinumab (AIN457) (Hueber *et al.*, 2010; Genovese *et al.*, 2013) y Ixekizumab (LY2439821) (Genovese *et al.*, 2010). Aunque su estudio está menos avanzado, también se ha desarrollado un anticuerpo frente al receptor, IL-17RA (Brodalumab o AMG827) (Martin *et al.*, 2013). Por otro lado, además del empleo de la IL-17 como diana terapéutica en la AR, también se ha sugerido su uso como biomarcador pronóstico. Un estudio realizado con pacientes que presentan una inadecuada respuesta al tratamiento con anti-TNF α propone que el nivel de IL-17 podría usarse como marcador de peor respuesta al tratamiento (Chen *et al.*, 2011c). De forma más generalizada, la asociación entre la expresión temprana de esta citocina en pacientes con AR y la severidad del daño articular, ha subrayado el posible valor pronóstico de la IL-17 para el tratamiento de los pacientes con AR.

Otro tipo de estrategia terapéutica en relación a las células Th17 va dirigida frente a moléculas de señalización implicadas en la diferenciación y función de estas células. Así, se ha propuesto como diana terapéutica la inhibición de RORC y RORA, mediante moléculas inhibidoras como la digoxina, el inhibidor sintético SR1001 o el ácido ursólico (Huh *et al.*, 2011; Solt *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). En la misma línea, la inhibición de la vía Jak-STAT3 también se ha propuesto como estrategia terapéutica. *In vitro* se ha comprobado que, por un lado, la inhibición de STAT3 en sinoviocitos de pacientes de AR inhibe la respuesta Th17 (Ju *et al.*, 2012) y, por otro lado, un inhibidor de la proteína Jak (Tofacitinib) inhibe directamente la producción de IL-17 e IFN γ , lo que resulta en una disminución de la secreción de citocinas pro-inflamatorias y de la sinovitis (Maeshima *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2012).

Tabla 12. Th17 y tratamiento de la AR: posibles estrategias terapéuticas.

Diana	Agente	Posible mecanismo de acción
IL-17	Anticuerpo anti-IL-17 Ej.: Secukinumab, Ixekizumab	Neutralización de IL-17.
IL-17R	Anticuerpo anti-IL-17R Ej.: Brodalumab	Bloqueo del receptor de la citocina IL-17.
ROR	Inhibidores factores de transcripción ROR. Ej.: Digoxina, SR1001, ácido ursólico	Inhibición de la diferenciación/función de las células Th17.
Jak/STAT3	Tofacitinib	Inhibición de la diferenciación/función de las células Th17.
TNFα/IL-17	ABT-122	Neutralización de IL-17 y TNF α .
IL-6R	Tocilizumab	Inhibición de la diferenciación/función de las células Th17.
IL-23/IL-12	Ustekinumab	Inhibición de la diferenciación/función de las células Th17.
IL-1R	Anakinra	Inhibición de la diferenciación/función de las células Th17.

Nota: Resumen de las posibles estrategias terapéuticas asociadas con células Th17 para el tratamiento en la AR. Modificado de Sarkar *et al.*, 2010.

Paralelamente a las dianas dirigidas directamente frente a la subpoblación Th17, se ha postulado la posibilidad de que otras dianas terapéuticas, extensamente empleadas en el tratamiento de la AR, modulen la respuesta Th17 de forma indirecta. Una de estas dianas terapéuticas podría ser la citocina TNF α . La sinergia entre IL-17 y TNF α concedería una explicación parcial de la eficacia de los inhibidores de TNF α atenuando los síntomas de la AR. Los efectos beneficiosos de la terapia anti-TNF α podrían involucrar un descenso en la producción de citocinas de tipo Th17 en los individuos respondedores. En esta línea, se han encontrado niveles altos de IL-17 y células Th17 en pacientes que presentan una respuesta inadecuada a la terapia anti-TNF α (Chen *et al.*, 2011c). Relacionado con ello, se ha desarrollado un anticuerpo con especificidad combinada para ambas citocinas, TNF α e IL-17, denominado ABT-122 (Miosec y Kolls, 2012). Por otro lado, la vía IL-6/IL-6R constituye otra diana terapéutica en pacientes con AR. Sus efectos beneficiosos podrían también en parte estar relacionados con las células Th17, ya que la IL-6 es, por un lado, un factor promotor del desarrollo de las células Th17 y, por otro lado, una de las citocinas cuya secreción es inducida por la IL-17. En este sentido, en artritis experimental se ha mostrado que el bloqueo de la IL-6 suprime la artritis por inhibición de la respuesta inflamatoria de tipo Th17 (Fujimoto *et al.*, 2008; Iwanami *et al.*, 2008; Mihara *et al.*, 2009). Otra diana terapéutica para el tratamiento de la AR es la molécula IL-12p40. Ustekinumab, que reconoce esta citocina, se ha probado en otras enfermedades reumáticas mostrando una inhibición de la producción de IFN γ e IL-17, lo que podría tener un efecto beneficioso en la AR (Sarkar *et al.*, 2010). Además de la terapia biológica frente a citocinas, otros fármacos frecuentemente empleados en la AR pueden también mediar sus efectos de forma indirecta a través de la modulación sobre las células Th17. Los DMARDs podrían ser uno de estos fármacos. En este sentido, se ha publicado que el

metotrexato, un conocido DMARD, inhibe *in vitro* la producción de IL-17 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AR (Li *et al.*, 2012b).

En resumen, las células Th17 se presentan como una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de la AR. Dada la falta de conocimiento de la implicación de estas células en la patología humana y el escaso desarrollo terapéutico al respecto, tales aspectos son en la actualidad interesantes motivos de estudio en el marco de la AR.

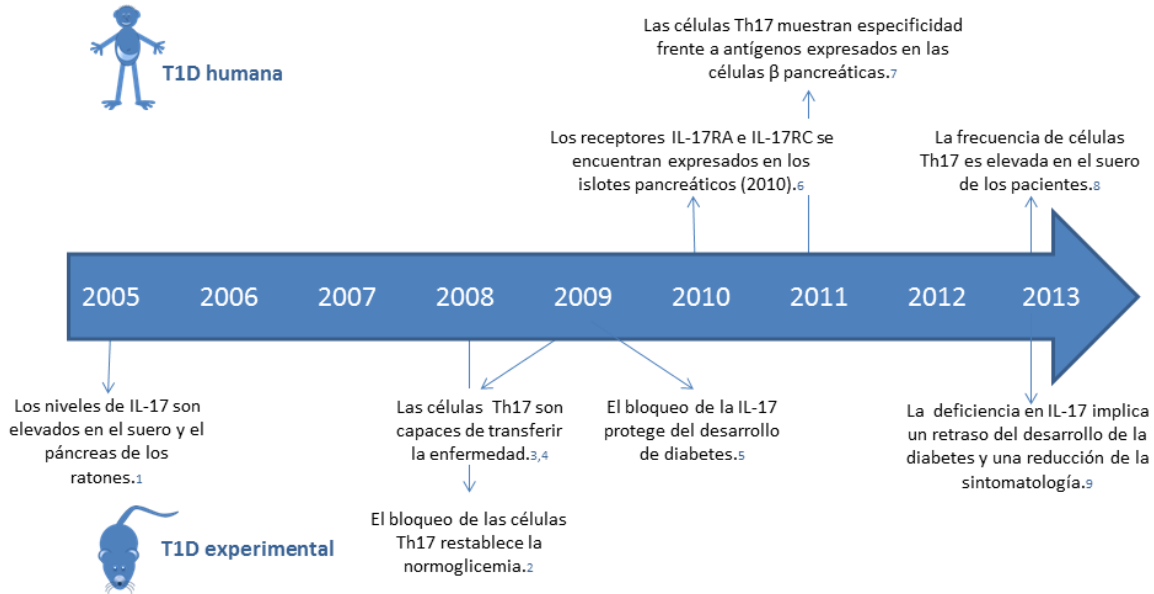
3.2. LINFOCITOS Th17 Y DIABETES AUTOINMUNE

Las células Th17 participan en el desarrollo de la T1D contribuyendo tanto en el comienzo como en las fases más avanzadas de la enfermedad (Haskins y Cooke, 2011; Shao *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Marwaha *et al.*, 2014). Su contribución en la patogenia de la diabetes se ha puesto en evidencia fundamentalmente en modelos animales tales como los ratones NOD o las ratas BB, siendo los primeros los que han mostrado más hallazgos al respecto (véase *Figura 31*). Gracias al empleo de estos modelos experimentales de T1D se ha manifestado que:

- ❖ Existe un aumento de las células Th17 o la expresión de IL-17 en el páncreas y el suero de los animales diabéticos (Vukkadapu *et al.*, 2005; Martin-Orozco *et al.*, 2009; van den Brandt *et al.*, 2010; Yaochite *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).
- ❖ Las células Th17 son capaces de transferir la enfermedad en experimentos de transferencia celular (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).
- ❖ Los ratones deficientes en IL-17 presentan un retraso en el comienzo de la diabetes y una reducida severidad de la insulinitis (Kuriya *et al.*, 2013).
- ❖ El bloqueo de las células Th17 o de la IL-17 previene de la diabetes (Jain *et al.*, 2008; Emamaullee *et al.*, 2009).

Estos hallazgos han destacado la implicación de las células Th17 en el desarrollo de la enfermedad en modelos experimentales. Sin embargo, dadas las dificultades para el estudio de la T1D en humanos, las funciones de las células Th17 en la patología de la enfermedad están muy poco definidas. A pesar de ello, varios estudios han caracterizado la expresión elevada de las células Th17 y IL-17 en el páncreas y la sangre periférica de pacientes con T1D (Bradshaw *et al.*, 2009; Honkanen *et al.*, 2010; Marwaha *et al.*, 2010; Arif *et al.*, 2011; Ferraro *et al.*, 2011; Ryba-Stanislaowska *et al.*, 2013). Más concretamente, un trabajo ha descrito la existencia de células Th17 auto-reactivas con especificidad frente a antígenos de las células β pancreáticas (Arif *et al.*, 2011). Además de la IL-17, algunos de estos estudios han hallado niveles elevados de otros marcadores asociados a la subpoblación Th17, tales como RORC e IL-22 en pacientes con T1D (Honkanen *et al.*, 2010; Arif *et al.*, 2011). Finalmente, se ha descrito también la expresión de IL-17RA e IL-17RC en los islotes pancreáticos de pacientes diabéticos (Honkanen *et al.*, 2010).

Figura 31. Principales hallazgos sobre la implicación de IL-17 en la diabetes autoinmune.



Nota: Resumen de los principales hallazgos asociados a la implicación de la IL-17 en la T1D tanto en humanos como en modelos animales. Referencias bibliográficas: 1. Vukkadapu *et al.*, 2005; 2. Jain *et al.*, 2008; 3. Bending *et al.*, 2009; 4. Martin-Orozco *et al.*, 2009; 5. Emamaullee *et al.*, 2009; 6. Honkanen *et al.*, 2010; 7. Arif *et al.*, 2011; 8. Ryba-Stanislaowska *et al.*, 2013; 9. Kuriya *et al.*, 2013.

3.2.1. Generación y/o activación de los linfocitos Th17 en la diabetes autoinmune

La presencia en el páncreas de las células Th17, tanto de los animales como de los pacientes diabéticos, sugiere que en los islotes se produce la generación y/o activación de estos linfocitos. Diversos eventos pueden promover el desarrollo de estas células. En primer lugar, se ha descrito que los altos niveles de glucosa inducen la expresión de los genes de citocinas de la familia IL-17, relacionando así el fallo metabólico propio de la T1D con la generación de una respuesta Th17 (Kumar *et al.*, 2014).

En segundo lugar, el ambiente inflamatorio pancreático caracterizado por la expresión de determinadas citocinas puede constituir un factor inductor de esta subpoblación linfocítica en los islotes pancreáticos. En este sentido, diferentes citocinas involucradas en la diferenciación y expansión de los linfocitos Th17 se encuentran asociadas a los procesos patológicos desencadenados en la T1D. Una de estas citocinas es la IL-6, cuya presencia se ha descrito en niveles elevados en el suero de pacientes diabéticos (Ryba-Stanislaowska *et al.*, 2013). Además, esta citocina se ha relacionado con las complicaciones asociadas al progreso de la T1D, tales como la nefropatía y la retinopatía, mostrando así su importante implicación en la patología de esta enfermedad (Myśliwiec *et al.*, 2006; Shelbaya *et al.*, 2012). Confirmando la hipótesis de que la presencia de la citocina en el ambiente inflamatorio pancreático promueve el desarrollo de las células Th17, se ha descrito que los niveles de IL-6 e IL-17 correlacionan positivamente en pacientes con T1D (Ryba-Stanislaowska *et al.*, 2013). Sumado a la IL-6, otra citocina que promueve la generación de la subpoblación Th17 es la IL-1 β . En diabetes experimental se ha descrito que la expresión de esta citocina, producida en respuesta a la presentación

de auto-antígenos de los islotes, promueve la generación de células Th17 (Bertin-Maghit *et al.*, 2011). En la misma línea que los hallazgos descritos, otro trabajo ha mostrado que los monocitos procedentes de pacientes diabéticos secretan espontáneamente IL-1 β e IL-6, induciendo más células Th17 que los individuos sanos (Bradshaw *et al.*, 2009). Por otra parte, la IL-21 que presenta acciones autocrinas sobre las células Th17, también se ha descrito en niveles elevados en ratones diabéticos (King *et al.*, 2004). Finalmente, otra citocina que también está involucrada tanto en la patogenia de la diabetes como en la expansión de las células Th17 es la IL-23. Esta citocina promueve el desarrollo de la diabetes mediante varios mecanismos, entre los que se incluye la inducción de la expresión de la IL-17 en los islotes pancreáticos (Mensah-Brown *et al.*, 2006). Englobando a tres citocinas anteriormente descritas, un estudio en ratones NOD ha mostrado que los niveles de IL-6, IL-1 β e IL-23 se encuentran elevados en estos ratones (Zhang *et al.*, 2012b).

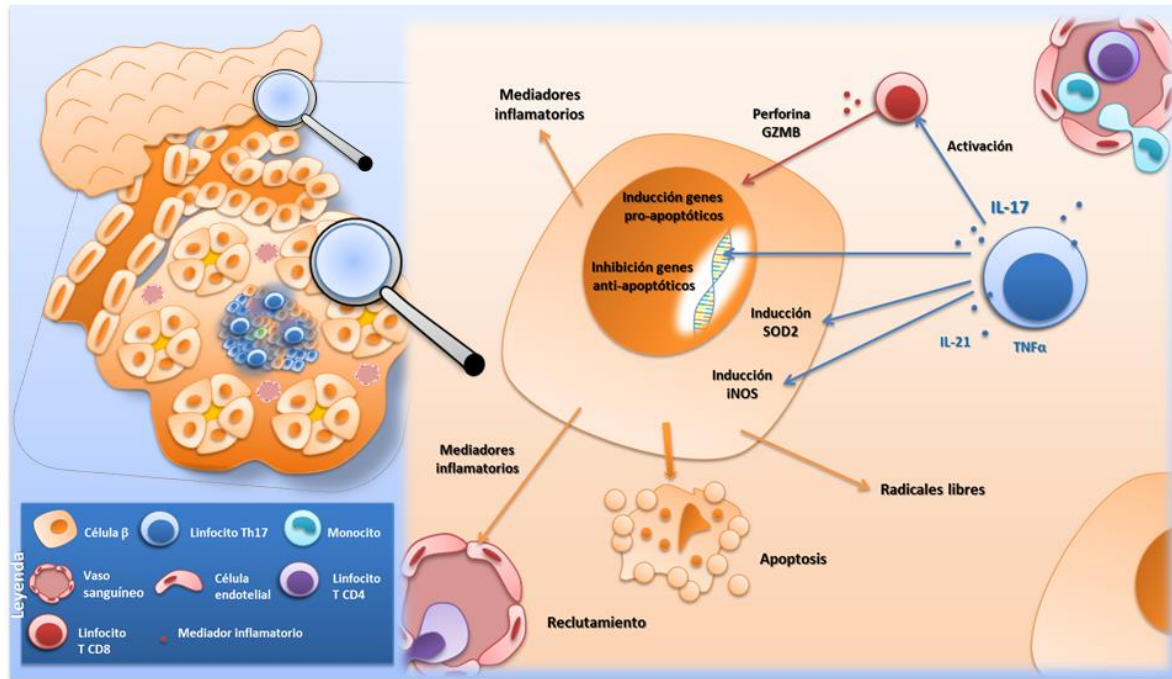
Por otra parte, dado que la respuesta de las células Th17 es inhibida por las células Treg, se ha sugerido que el fallo en las células Treg que tiene lugar en la T1D puede promover la expansión de los linfocitos Th17 (Ferraro *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2012).

De manera que, diferentes vías pueden converger potenciando la generación y/o activación de las células Th17 en el ambiente pancreático, lo que a su vez promueve el desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria en los islotes.

3.2.2. Función de los linfocitos Th17 en la diabetes autoinmune

A pesar de que las diversas evidencias descritas anteriormente muestran la implicación de las células Th17 en la T1D tanto en modelos animales como en pacientes, la función concreta de estas células en el desarrollo de la enfermedad se ha determinado escasamente. No obstante algunos hallazgos implican diversos mecanismos de acción de estas células (véase *Figura 32*). Se ha descrito que la **IL-17** es capaz de inducir la apoptosis de las células β pancreáticas. Por un lado, esta citocina promueve la apoptosis de las células de los islotes inhibiendo la expresión de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2, y a la vez aumentan la expresión de genes pro-apoptóticos (Honkanen *et al.*, 2010). Además, se ha observado que la IL-17 promueve la expresión de la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2) en las células β pancreáticas (Honkanen *et al.*, 2010). También, se ha descrito que la IL-17 estimula la actividad de la enzima iNOS en las células β pancreáticas murinas, promoviendo así la producción de ON el cual también conduce finalmente a la destrucción de estas células (Miljkovic *et al.*, 2005).

Figura 32. Función de las células Th17 en la diabetes autoinmune.



Nota: Resumen de los principales factores y tipos celulares implicados en las funciones promovidas por las células Th17 durante la respuesta inflamatoria desencadenada sobre las células β pancreáticas en la T1D.

Por otra parte, además de los mecanismos que atañen directamente a las células β pancreáticas, se ha sugerido que un posible mecanismo de acción indirecto de las células Th17 es la inducción de la respuesta de los CTLs, los cuales una vez activados dan lugar a la destrucción de las células β pancreáticas mediante mecanismos dependientes de perforina (Ankathatti *et al.*, 2011).

Además, la IL-17 ejerce funciones sobre las células de los islotes en sinergia con otras citocinas, fundamentalmente IL-1β e IFNγ, las cuales están fuertemente involucradas en la patogenia de la enfermedad. En este sentido se ha descrito que IL-17 en sinergia con ambas citocinas promueve la expresión de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa 2 (NOS2A, del inglés *Nitric Oxide Synthase 2*) y de la enzima COX-2 en las células β pancreáticas, las cuales están involucradas en la respuesta inflamatoria desencadenada por estas células (Honkanen *et al.*, 2010). Además, en este mismo trabajo se describe que la IL-17 potencia el efecto pro-apoptótico ejercido por ambas citocinas ejercido sobre las células de los islotes (Honkanen *et al.*, 2010). Paralelamente, se ha mostrado que la IL-17 agrava los efectos de la combinación de IFNγ e IL-1β o TNFα e IFNγ promoviendo la producción de ON (Arif *et al.*, 2011). La relación de cooperación entre las citocinas es mutua, ya que también se ha descrito que IL-1β e IFNγ promueven la función de la IL-17 induciendo la expresión del receptor IL-17RA en las células β pancreáticas (Arif *et al.*, 2011).

Sumado a la amplificación de la función de las células por mecanismos sinérgicos, el subconjunto Th17 también promueve la respuesta inflamatoria de la T1D a través de la secreción otras citocinas, fundamentalmente IL-21. Numerosas evidencias han vinculado estrechamente a esta citocina y su receptor con el desarrollo patológico de la T1D. En relación a la susceptibilidad genética, en modelos animales se ha encontrado asociación entre esta citocina (localizada en el loci *Idd3*) y el

riesgo de padecer diabetes (Prochazka *et al.*, 1987; McGuire *et al.*, 2009). Igualmente, en humanos, se han asociado variantes genéticas de IL-21 e IL-21R con la susceptibilidad frente a la T1D, sugiriendo su implicación en el desarrollo patológico de la enfermedad (Asano *et al.*, 2007). En modelos animales se ha descrito que la IL-21 o su receptor se requieren para inducir el desarrollo de la diabetes y que los ratones deficientes en IL-21 o IL-21R o aquellos en los que se bloquea la vía IL-21/IL-21R no desarrollan diabetes (Datta y Sarvetnick 2008; Spolski *et al.*, 2008; Stutherland *et al.*, 2009; McGuire *et al.*, 2011; Van Belle *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Paralelamente, se ha observado que en ratones NOD, los niveles de IL-21 e IL-21R son elevados (King *et al.*, 2004).

En relación a los mecanismos a través de los cuales la IL-21 promueve la inflamación se han descrito varias vías. En primer lugar, dado que la IL-21 induce la generación de las propias células Th17, la expansión de esta subpoblación puede ser uno de los mecanismos a través de los cuales esta citocina contribuye a la patogenia. De hecho, se ha observado que la IL-21 promueve la generación de las células Th17 en los ratones NOD (Liu *et al.*, 2011) y que su deficiencia va ligada a un descenso de las estas células (Spolski *et al.*, 2008). Así mismo, la sobre-expresión de esta interleucina en las células β pancreáticas, induce la expresión de IL-17 (Stutherland *et al.*, 2009). Además, esta sobre-expresión conduce a la producción de otros mediadores inflamatorios como citocinas (IFN γ) o quimiocinas (CCL2, CCL8 y CXCL10), promoviendo así la infiltración linfoide en los islotes (Stutherland *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha mostrado que esta citocina promueve la activación y la proliferación de los CTLs auto-reactivos (McGuire *et al.*, 2011; Ramanathan *et al.*, 2011; Van Belle *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). La inducción de la función de los CTLs por parte de la IL-21 tiene lugar mediante el aumento de la expresión de T-bet, lo que promueve la producción de moléculas citotóxicas como perforina y GZMB (Stutherland *et al.*, 2013). Otros mecanismos de acción que se han descrito para esta citocina incluyen la correcta señalización CD40-CD40L y la capacidad de las DCs de expresar MHC II y CCR7 (Van Belle *et al.*, 2012).

Otra citocina producida por las células Th17 que también está involucrada en la patogenia de la enfermedad es TNF α . En relación a esta citocina, se ha descrito que la secreción de TNF α es otro mecanismo de contribución de los linfocitos Th17 a la T1D (Li *et al.*, 2014).

La función patológica de las células Th17 puede verse agravada por los mecanismos de **plasticidad linfoide**. En relación a la plasticidad entre las células Th17 y Th1, en primer lugar se ha descrito la existencia de células co-expresoras de IL-17 e IFN γ en pacientes con T1D (Honkanen *et al.*, 2010). En segundo lugar, se ha mostrado la conversión de las células Th17 en linfocitos Th1 en ratones diabéticos (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009). Estos trabajos muestran que las células Th17 son capaces de generar diabetes en ratones NOD-SCID pero sólo generan insulitis en ratones NOD, mientras que inducen diabetes si se convierten en células productoras de IFN γ (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009). En la misma línea, se ha observado que aunque la deficiencia de la IL-17 muestra un retraso en el comienzo de la diabetes y una menor severidad de la misma, sin embargo la deficiencia conjunta de IL-17 e IFN γ conlleva la prevención total del desarrollo de diabetes

en los ratones NOD (Kuriya *et al.*, 2013). Por otra parte, en relación a la plasticidad linfoide de las células Treg hacia el fenotipo Th17, en ratones NOD se ha descrito la existencia de células que co-expresan Foxp3 y ROR γ t con capacidad supresora (Tartar *et al.*, 2010). Sin embargo, otros autores han observado que los pacientes con T1D presentan una proporción aumentada de células Treg con capacidad de secretar IL-17 (Marwaha *et al.*, 2010).

3.2.3. Linfocitos Th17 y tratamiento de la diabetes autoinmune

Dado que numerosos hallazgos postulan que las células Th17 son mediadores clave en la patogenia de la T1D, se ha propuesto que estrategias terapéuticas diseñadas para inhibir estas células podrían ser efectivas en el tratamiento de la enfermedad (Shao *et al.*, 2012; Marwaha *et al.*, 2014). A pesar de que un estudio ha descrito que el silenciamiento del mRNA que codifica para la IL-17 no protege del desarrollo de la diabetes (Joseph *et al.*, 2012), sin embargo, en el modelo NOD se ha descrito que el uso de anticuerpos anti-IL-17 impacta en el curso de la diabetes (Emamaullee *et al.*, 2009). Así mismo, el empleo de inhibidores de la respuesta Th17, como la IL-25, previene de la progresión de la diabetes en ratones pre-diabéticos, restablece la normoglicemia en ratones diabéticos de reciente comienzo y reduce significativamente la autoinmunidad (Emamaullee *et al.*, 2009). En el mismo sentido, se ha mostrado que el bloqueo de la subunidad IL-12p40 en los ratones NOD conduce a la supresión de la enfermedad, aunque el efecto se pierde en función del tiempo de administración del tratamiento (Fujihira *et al.*, 2000). Todas estas evidencias muestran el beneficio del bloqueo de las células Th17 en los ratones NOD, sin embargo en humanos pocos avances se han realizado al respecto. Al contrario que otras enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes en los que se han llevado a cabo diferentes ensayos clínicos, no se han desarrollado ensayos clínicos con terapias dirigidas específicamente frente a las células Th17. No obstante, en la actualidad se está desarrollando un ensayo clínico con Ustekinumab (anticuerpo monoclonal anti-IL-12p40), el cual actúa sobre las células Th17 mediante el bloqueo de la IL-23 (Marwaha *et al.*, 2014).

4. VIP: AGENTE TERAPÉUTICO EN INFLAMACIÓN Y AUTOINMUNIDAD

El progresivo conocimiento de las funciones biológicas de VIP, así como sus mecanismos de acción, ha abierto un amplio abanico de posibilidades terapéuticas para el tratamiento de múltiples alteraciones (Gozes *et al.*, 1999). Se ha sugerido la aplicación de VIP, o sus análogos, como agente terapéutico en varias enfermedades que atañen al SN, sistema respiratorio, aparato reproductor, tracto gastrointestinal o sistema visual, entre otros. Así, por ejemplo, la aplicación clínica de VIP se ha estudiado extensamente en la disfunción eréctil, la hipertensión pulmonar o los trastornos de la motilidad gastrointestinal, entre otras alteraciones. Sumado a este potencial como agente terapéutico, se ha destacado también su valor como marcador diagnóstico o pronóstico. Así, la identificación de VIP o sus receptores presenta valor diagnóstico en múltiples tipos de cáncer (Tang *et al.*, 2014).

La gran diversidad en cuanto al potencial terapéutico de VIP se debe a sus múltiples acciones biológicas. De tal manera que, sus efectos neurotróficos, neuroprotectores, vasodilatadores,

broncodilatadores, citoprotectores, anti-inflamatorios, etc., dan lugar a una amplia variedad de mecanismos de acción terapéuticos. De entre todos ellos, el efecto anti-inflamatorio de VIP es uno de los más destacados. A través de este efecto VIP limita el comienzo de la inflamación y la respuesta inmune, así como promueve la resolución de la misma. Por ello, ha sido propuesto como candidato terapéutico en el tratamiento de numerosas enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. En tales enfermedades, el efecto terapéutico de VIP está relacionado con la reducción de los eventos inflamatorios tempranos que inician la inflamación o autoinmunidad, así como los eventos posteriores asociados con la activación crónica de la respuesta inflamatoria. De tal manera que, la administración de VIP en modelos experimentales de varias enfermedades retrasa el comienzo, decrece la frecuencia y reduce la severidad de la enfermedad. Su eficacia como agente terapéutico se ha puesto de manifiesto en modelos animales de diabetes autoinmune, artritis reumatoide, sepsis o choque séptico, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple, entre otras (Delgado *et al.*, 1999f; Delgado *et al.*, 2001; Abad *et al.*, 2003; Fernandez-Martin *et al.*, 2006a; Lodde *et al.*, 2006; Rosignoli *et al.*, 2006). La *Tabla 13* expone éstas y otras enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes en las que se han mostrado efectos terapéuticos de VIP o sus análogos en modelos animales.

Múltiples mecanismos a diferentes niveles están involucrados en la regulación de la inflamación en estas enfermedades, tanto a nivel sistémico como local. Generalmente los efectos terapéuticos de VIP en enfermedades inflamatorias y autoinmunes se han asociado a la inhibición de las respuestas autoinmunes relacionadas con las células Th1 y Th17, así como a la inducción de las respuestas anti-inflamatorias de tipo Th2 e iTreg. Esta modulación de las respuestas Th se ha mostrado en modelos animales de diabetes autoinmune, artritis reumatoide y esclerosis múltiple, entre otras enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes (Fernández-Martin *et al.*, 2006b; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006b; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006c; Li *et al.*, 2006b; Rosignoli *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008b; Deng *et al.*, 2010). La regulación de las subpoblaciones Th, junto con las acciones de VIP sobre citocinas, quimiocinas, mediadores de estrés oxidativo, moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras, hacen de este péptido un importante candidato terapéutico en múltiples enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes.

Tabla 13. Efectos terapéuticos de VIP en modelos experimentales de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes.

Enfermedad	Modelo experimental	Referencias
Sepsis/Endotoxemia		
	LPS	Delgado <i>et al.</i> , 1999f; Bik <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2006a.
	LPS/ <i>Escherichia coli</i>	Chorny y Delgado, 2008.
	CLP	Qiu <i>et al.</i> , 2007; Toscano <i>et al.</i> , 2010.
Artritis Reumatoide		
	CIA	Delgado <i>et al.</i> , 2001; Williams, 2002; Chorny <i>et al.</i> , 2005; Juarranz <i>et al.</i> , 2005; Yin <i>et al.</i> , 2005; Gonzalez-Rey <i>et al.</i> , 2006b; Zhang <i>et al.</i> , 2006b; Delgado <i>et al.</i> , 2008a; Deng <i>et al.</i> , 2010; Vessillier <i>et al.</i> , 2012.
Enfermedad Inflamatoria Intestinal		
	TNBS	Abad <i>et al.</i> , 2003; Abad <i>et al.</i> , 2005; Gonzalez-Rey y Delgado, 2006; Arranz <i>et al.</i> , 2008c.
Diabetes autoinmune		
	NOD	Herrera <i>et al.</i> , 2006; Rosignoli <i>et al.</i> , 2006.
	STZ	Yu <i>et al.</i> , 2011.
Esclerosis Múltiple		
	EAE	Fernández-Martín <i>et al.</i> , 2006a; Gonzalez-Rey <i>et al.</i> , 2006c; Li <i>et al.</i> , 2006b; Cobo <i>et al.</i> , 2013;
Uveitis		
	EIU	Lajavardi <i>et al.</i> , 2007.
	EAU	Camelo <i>et al.</i> , 2009; Keino <i>et al.</i> , 2004.
Síndrome de Sjögren		
	NOD	Lodde <i>et al.</i> , 2006.
Pancreatitis		
	LPS y ceruleína	Kojima <i>et al.</i> , 2005.
Hepatitis		
	ConA	Lou <i>et al.</i> , 2009.

Nota: Resumen de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en las que se han mostrado efectos terapéuticos de VIP o sus análogos en modelos animales. La columna *Modelo Experimental* refleja el nombre del modelo animal de la enfermedad o el agente con el cual se induce la misma.

Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos que se están realizando en relación al empleo de VIP en la terapia clínica, su uso como agente terapéutico se encuentra limitado fundamentalmente debido a su corta vida media. Este hecho resulta en una baja potencia y una corta duración de la acción en su aplicación clínica. Esto es debido a que tras la administración sistémica de VIP se produce una rápida digestión enzimática del péptido (Caughey *et al.*, 1988; Goetzl *et al.*, 1989; Gourlet *et al.*, 1997a). Dado el gran potencial terapéutico de VIP, se han realizado numerosísimos estudios acerca de la farmacocinética y las vías de administración adecuadas para el tratamiento con el péptido. Para solventar el problema de su degradación fisiológica, se han empleado diversas estrategias (véase *Tabla*

15), tales como la modificación de la estructura convirtiéndola en cíclica, la administración conjunta de VIP con inhibidores de peptidasas o la asociación de VIP a estructuras lipídicas o nanopartículas, entre otras estrategias. Las terapias génica y celular también se han empleado para el tratamiento con el péptido. El tratamiento con VIP, mediante el uso de vectores virales o plásmidos y la transferencia de células Treg, DCs o células madre mesenquimales generadas en presencia de VIP, ha sido empleado en modelos animales de artritis reumatoide, diabetes autoinmune, esclerosis múltiple y sepsis (Chorny *et al.*, 2005; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006b; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006c; Herrera *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2008a; Toscano *et al.*, 2010; Cobo *et al.*, 2013). Por otro lado, también se han empleado vías alternativas de administración, como la vía nasal o inhalación. Además de la exigüidad de su vida media, otro obstáculo que reduce el uso terapéutico de VIP es su capacidad de unirse, aunque a baja afinidad, a diferentes receptores, como el receptor de secretina o de GRF (Laburthe *et al.*, 2007). Ésta podría ser la causa de la aparición de efectos secundarios como la hipotensión o la diarrea (Laburthe *et al.*, 2007). Sumado a esto, otro problema es la posibilidad de unión del péptido a múltiples dianas celulares. Para solventarlo, son necesarias estrategias terapéuticas que permitan la especificidad de tejido. Por todo ello, actualmente se sigue investigando acerca de la creación de nuevos agonistas más estables y más selectivos, y nuevas vías de administración que permitan resultados más satisfactorios. Así mismo, se trabaja en el estudio de su posología y toxicidad con objeto de aplicar el péptido en la terapia clínica en múltiples enfermedades.

Tabla 14. Principales estrategias terapéuticas para el tratamiento con VIP.

Estrategia terapéutica	Referencias
Desarrollo de análogos.	Bolin <i>et al.</i> , 1995a; Bolin <i>et al.</i> , 1995b; Bolin <i>et al.</i> , 1996; Moro <i>et al.</i> , 1997; Xia <i>et al.</i> , 1997; Nicole <i>et al.</i> , 2000; Tams <i>et al.</i> , 2000; Langer <i>et al.</i> , 2004b; Onoue <i>et al.</i> , 2004; Igarashi <i>et al.</i> , 2005; Dangoor <i>et al.</i> , 2006; Ohmori <i>et al.</i> , 2006; Dangoor <i>et al.</i> , 2007; Dangoor <i>et al.</i> , 2008; Onoue <i>et al.</i> , 2011; Vessillier <i>et al.</i> , 2012; Onoue <i>et al.</i> , 2013.
Asociación de VIP a lípidos, liposomas o micelas.	Suzuki <i>et al.</i> , 1995; Gololobov <i>et al.</i> , 1998; Hatipoglu <i>et al.</i> , 1998; Onyüksel <i>et al.</i> , 1999; Onyüksel <i>et al.</i> , 2003; Stark <i>et al.</i> , 2007; Hajos <i>et al.</i> , 2008; Stark <i>et al.</i> , 2008; Onyüksel <i>et al.</i> , 2009; Gülçür <i>et al.</i> , 2013; Sethi <i>et al.</i> , 2013.
Asociación de VIP a nanopartículas y otras moléculas.	Bickel <i>et al.</i> , 1993; Dufes <i>et al.</i> , 2004; Dribek <i>et al.</i> , 2007; Gao <i>et al.</i> , 2007; Wernig <i>et al.</i> , 2008; Fernandez-Montesinos <i>et al.</i> , 2009; Ortner <i>et al.</i> , 2010; Reichstetter <i>et al.</i> , 2013.
Administración conjunta de VIP con inhibidores de peptidasas.	Tam <i>et al.</i> , 1990; Wollman <i>et al.</i> , 2002.
Terapia génica.	Lodde <i>et al.</i> , 2004; Herrera <i>et al.</i> , 2006; Lodde <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2006b; Delgado <i>et al.</i> , 2008a; St Hilaire <i>et al.</i> , 2009; Toscano <i>et al.</i> , 2010.
Terapia celular.	Chorny <i>et al.</i> , 2005; Gonzalez-Rey <i>et al.</i> , 2006b; Cobo <i>et al.</i> , 2013.

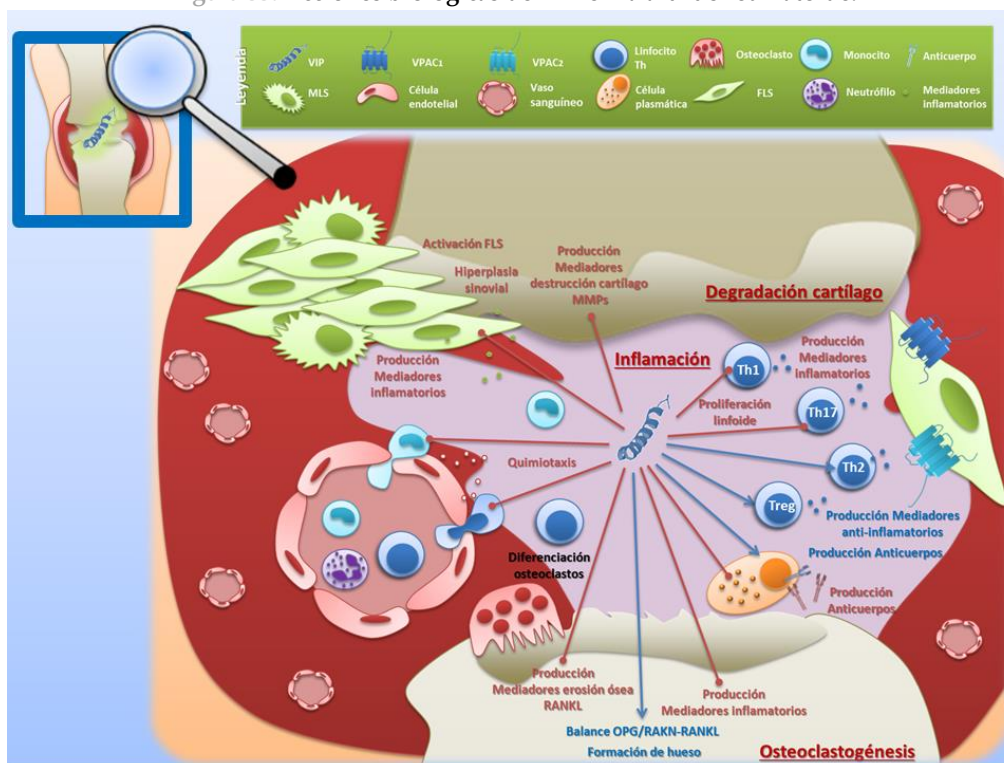
Nota: Resumen de las principales estrategias terapéuticas para el uso clínico de VIP. La tabla recoge algunos ejemplos de las múltiples estrategias desarrolladas para el tratamiento con VIP de diversas enfermedades.

4.1. VIP COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es un modelo de enfermedad sistémica, inflamatoria y autoinmune en la que se manifiestan las complejas relaciones que existen entre diferentes sistemas. Los procesos inflamatorios y patológicos que tienen lugar en la AR están regulados por múltiples interacciones entre los sistemas inmune, nervioso, endocrino y cardiovascular (Baerwald *et al.*, 2000). La inervación neuroendocrina de la articulación es compleja, siendo numerosos los neurotransmisores y hormonas que modulan los procesos inflamatorios y patológicos desarrollados en la articulación (Sakane y Suzuki, 2000; Niissalo *et al.*, 2002; Pongratz y Straub, 2013). Uno de estos mediadores es el neuropéptido VIP, el cual es secretado por las fibras sensoriales que inervan la articulación artrítica (Niissalo *et al.*, 2002).

El **efecto terapéutico** de VIP está asociado a una fuerte reducción de los dos principales componentes de la enfermedad, la autoinmunidad y la respuesta inflamatoria. A su vez, en la respuesta inflamatoria modula tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa. De tal modo que VIP es capaz de modular los eventos tempranos promovidos en la AR, inhibiendo el inicio y establecimiento de la autoinmunidad, así como las fases más tardías asociadas a la inflamación destructiva. Así, VIP inhibe todos los procesos característicos de la AR, como son la inflamación crónica sinovial, la formación del *pannus* y la degradación del cartílago, la erosión ósea y la deformación de la articulación (véase Figura 33).

Figura 33. Acciones biológicas de VIP en la artritis reumatoide.



Nota: Resumen de los principales factores y tipos celulares modulados por VIP durante la respuesta inflamatoria desencadenada en las articulaciones en la AR. El color azul indica *Inducción* y el color rojo *Inhibición*.

En modelos experimentales de AR, se ha descrito la presencia de receptores para VIP y se ha visto que los niveles del péptido se encuentran aumentados en el suero y las articulaciones de ratones

artríticos durante el desarrollo de la enfermedad (Delgado *et al.*, 2002a). Esos niveles elevados de VIP, así como la presencia de sus receptores, sugieren que este sistema endógeno puede actuar como un agente anti-reumático natural, activado en respuesta a las condiciones inflamatorias y autoinmunes (Delgado *et al.*, 2002a). Sin embargo, la auto-regulación de la función inmune no se logra dada la severidad de la inflamación, la cual impide que se consiga el efecto regulador intrínseco. No obstante, la administración exógena de este neuropéptido en ratones artríticos si consigue inhibir el desarrollo de la patología, ya que el tratamiento con VIP da lugar al retraso del comienzo de la enfermedad, la reducción de la severidad de los síntomas y de la incidencia de CIA, y la prevención del daño en la articulación (Delgado *et al.*, 2001; Zafirova *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008b; Delgado *et al.*, 2008a; Deng *et al.*, 2010). El estudio de los modelos experimentales de AR ha permitido clarificar numerosas funciones de VIP en la AR. En relación a la autoinmunidad, se ha mostrado que VIP reduce los niveles de los auto-anticuerpos generados frente al colágeno (Vessillier *et al.*, 2012). Asociado a la inflamación, se han descrito diversas citocinas pro-inflamatorias que son moduladas por VIP, incluyendo, TNF α , IFN γ , IL-1, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17 e IL-18 (Delgado *et al.*, 2001; Williams, 2002; Zafirova *et al.*, 2004; Juarranz *et al.*, 2005; Leceta *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008b; Delgado *et al.*, 2008a; Vessillier *et al.*, 2012; Sheti *et al.*, 2013). Contrariamente, este péptido aumenta la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-4 o IL-1Ra (Delgado *et al.*, 2001; Zafirova *et al.*, 2004; Juarranz *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2008a; Sheti *et al.*, 2013). Además de la expresión de citocinas, VIP inhibe la expresión de diversas quimiocinas (Delgado *et al.*, 2001). Relacionado con la destrucción del cartílago y la erosión ósea se ha mostrado que VIP presenta un efecto protector (Juarranz *et al.*, 2005). Se ha descrito que VIP inhibe la expresión de MMP-2 y MMP-9 en artritis experimental (Delgado *et al.*, 2001; Sheti *et al.*, 2013). Paralelamente, VIP previene de la erosión ósea mediante varios mecanismos. Por un lado, VIP disminuye la expresión de citocinas y otros mediadores inflamatorios involucrados en la destrucción de la articulación, como IL-1, TNF, IL-6, IL-11, IL-17, COX-2, iNOS y PGE2 (Juarranz *et al.*, 2005). Por otro lado, VIP reduce la expresión de RANK y RANKL e incrementa la expresión de OPG, decreciendo el ratio RANKL/OPG (Juarranz *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2010). De tal modo que modula el sistema RANK/RANKL/OPG promoviendo la formación de hueso. Referente a la función de VIP sobre los linfocitos Th, VIP disminuye la expansión clonal de los linfocitos Th, reduciendo así la respuesta auto-reactiva de propia de la AR (Delgado *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008b). Además de la expansión, se ha descrito que este neuropéptido es capaz de regular diferencialmente las distintas subpoblaciones Th. VIP inhibe la respuesta de tipo Th1 y regula el equilibrio Th1/Th2 disminuyendo la producción de IFN γ y los niveles de IgG2a (asociado a Th1) y aumentando la producción de IL-4 y los niveles de IgG1 (asociado a Th2) (Delgado *et al.*, 2001; Zafirova *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2008a; Deng *et al.*, 2010). Sobre las células Th17 se ha descrito que VIP inhibe la funcionalidad de esta subpoblación linfoide en ratones artríticos (Juarranz *et al.*, 2005; Leceta *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2010). Por otro lado, VIP presenta una acción anti-inflamatoria puesto que promueve la respuesta de tipo Treg (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2008b; Delgado *et al.*, 2008a; Deng *et al.*, 2010).

En humanos también se ha encontrado expresión de VIP en el tejido sinovial reumatoide (Pulsatelli *et al.*, 2006) y se ha detectado expresión del péptido en el suero y el líquido sinovial de pacientes con AR (Buljevic *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2014). Así mismo, en pacientes con AR, se ha descrito la expresión de receptores para VIP en los FLS, los cuales presentan una mayor expresión de VPAC₂ que VPAC₁ (Takeba *et al.*, 1999; Juarranz *et al.*, 2008). Respecto a VPAC₁, se ha descrito una asociación entre la presencia de un polimorfismo en el receptor y la susceptibilidad de la AR (Delgado *et al.*, 2008b). Numerosos efectos terapéuticos de VIP se han observado a partir de muestras procedentes de pacientes con AR. En primer lugar, VIP interviene en la modulación de características propias de la inmunidad innata. Este neuropéptido reduce la expresión y señalización en FLS de receptores tales como TLR4, el receptor inducible por ácido retinoico 1 (RIG-1, del inglés *Retinoid acid Inducible Gene-1*) y la proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5 (MDA5, del inglés *Melanoma Differentiation Associated protein 5*), inhibiendo así la respuesta pro-inflamatoria desencadenada en la AR. (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008a; Carrión *et al.*, 2011). Por otra parte, relacionado con la inflamación, VIP disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IFN γ e IL-6 y aumenta la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4 sobre FLS y linfocitos de sangre periférica (Takeba *et al.*, 1999; Juarranz *et al.*, 2004; Arranz *et al.*, 2008a; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2011). Sumado a ello, este péptido inhibe la expresión de varias quimiocinas, tales como CCL2, CCL5 y CXCL8 sobre FLS y linfocitos de sangre periférica de pacientes con AR (Juarranz *et al.*, 2004; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008a; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2011). La expresión de otros mediadores de inflamación, como COX-2 y PGE2 también se modula en presencia de VIP en FLS de pacientes con AR (Pérez-García *et al.*, 2011). Además de inhibir la producción de mediadores inflamatorios, VIP es capaz de inhibir la proliferación de las células sinoviales de los pacientes con AR (Takeba *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2005; Carrión *et al.*, 2014). Por otra parte, VIP muestra una acción protectora sobre la destrucción del cartílago. Sobre FLS de pacientes con AR también se ha mostrado un efecto inhibitor de VIP sobre la producción de distintos mediadores de destrucción de la articulación, entre los que se incluyen MMPs y alarminas, como MMP-1, MMP-2 y MMP-3 y S100A8 y S100A9 (Takeba *et al.*, 1999; Carrión *et al.*, 2011; Carrión *et al.*, 2014). En relación al efecto de VIP sobre los linfocitos Th, se ha descrito también en AR humana que VIP regula el equilibrio entre las subpoblaciones Th1/Th2 disminuyendo la producción de IFN γ y promoviendo la de IL-4, promoviendo por tanto la respuesta de tipo Th2 (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2008). Además se ha descrito que VIP presenta un efecto modulador negativo de la subpoblación Th1 al inhibir la expresión de IL-12p35 (Carrión *et al.*, 2014). Así mismo, VIP presenta un efecto inhibitor sobre la respuesta causada por la subpoblación Th17 ya que este neuropéptido reduce la expresión de IL-23p19, IL-17RA e IL-22R1 en FLS de pacientes con AR (Carrión *et al.*, 2013; Carrión *et al.*, 2014).

La capacidad de VIP para modular las diferentes subpoblaciones Th, inhibir la expresión de mediadores de inflamación y degradación, promover la expresión de factores anti-inflamatorios, etc, sugiere que este neuropéptido podría ser un agente terapéutico en el **tratamiento** de pacientes con AR. Diferentes estrategias han mostrado los efectos beneficiosos de VIP en artritis experimental. La terapia

génica ha sido una de estas estrategias terapéuticas empleadas, a través de la cual se consigue inhibir la inflamación y la destrucción del cartílago y el hueso (Zhang y Shen, 2006; Delgado *et al.*, 2008a; Vessilier *et al.*, 2012). Otro tipo de estrategias terapéuticas, como la inserción del péptido en micelas de fosfolípidos también han conseguido eficacia clínica en artritis experimental (Sheti *et al.*, 2013). Todo ello promueve el posible uso de VIP en la clínica como agente terapéutico. Por otro lado, además del empleo de VIP como tal, se ha descrito su uso como marcador pronóstico en pacientes con AR (Martínez *et al.*, 2014). Este estudio propone el empleo de VIP como biomarcador pronóstico para los pacientes con esta enfermedad. Los resultados de este trabajo muestran que, por un lado, existe una correlación negativa entre el índice de actividad de la enfermedad y los niveles de VIP en el suero de los pacientes y, por otro lado, los bajos niveles de VIP se asocian con una peor progresión de la enfermedad a pesar de la administración de un tratamiento mayor. En suma, la correlación de la deficiencia de VIP con el grado de actividad de la enfermedad, la expresión del péptido y sus receptores en el foco inflamatorio, los múltiples efectos moduladores descritos, así como la eficacia clínica mostrada en artritis experimental han propuesto que VIP puede ser un candidato terapéutico idóneo en la AR.

4.2. VIP COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN LA DIABETES AUTOINMUNE

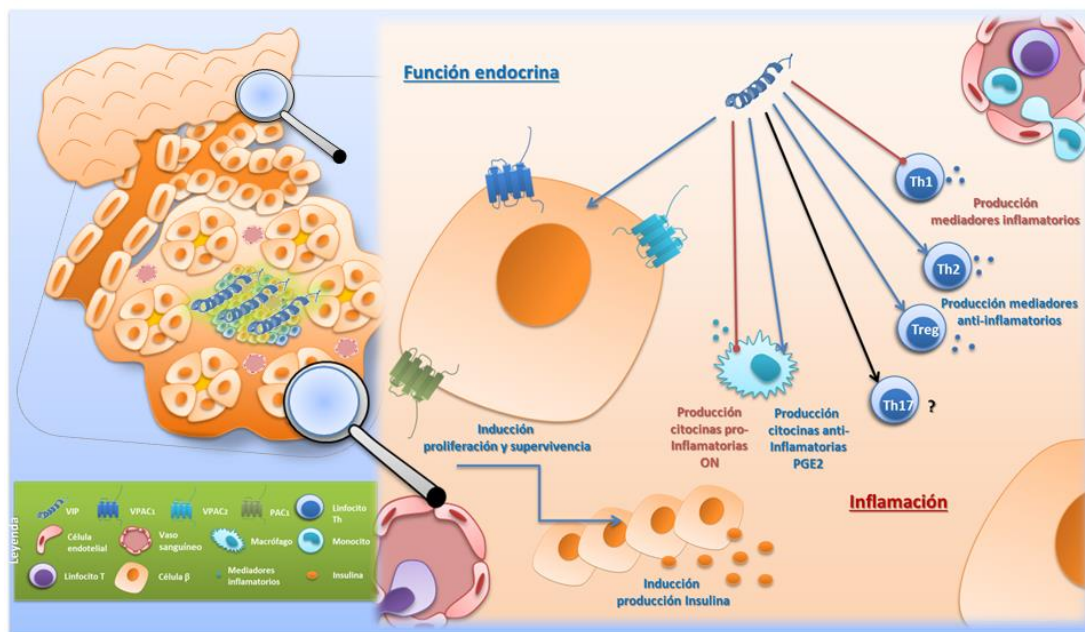
El desarrollo patológico de la T1D implica la interacción entre los sistemas endocrino, inmune y nervioso. Los islotes pancreáticos son una región fuertemente inervada por nervios parasimpáticos, simpáticos y sensoriales, los cuales contienen diversos neurotransmisores que regulan la función fisiológica del órgano (Ahrén, 2000). El neuropéptido VIP es una de estos neurotransmisores localizado en las fibras nerviosas de los islotes pancreáticos (Bishop *et al.*, 1980). Los receptores para VIP, VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁, se han localizado en las células β pancreáticas de los islotes, capacitando a éstas células para responder al péptido (Inagaki *et al.*, 1994; Borboni *et al.*, 1999; Jamen *et al.*, 2002).

Los efectos beneficiosos de VIP en relación a la T1D se han observado en modelos animales en los que se han llevado a cabo experimentos *in vitro* e *in vivo*. Gracias al empleo de estos modelos, se ha demostrado que el tratamiento de ratones NOD con VIP reduce o inhibe el desarrollo de la insulitis y la aparición de la diabetes (Herrera *et al.*, 2006; Rosignoli *et al.*, 2006). Este neuropéptido por una parte es capaz de promover la función endocrina del páncreas, actuando de forma antagónica sobre el déficit de insulina característico de la enfermedad. Por otra parte, interviene sobre el componente inflamatorio ejerciendo un efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio. De tal modo que, el **efecto terapéutico** de VIP estaría asociado tanto con el defecto en la secreción endocrina pancreática como con el proceso inflamatorio, que tienen lugar durante la T1D. En relación a la **función endocrina pancreática**, en primer lugar se ha descrito que VIP promueve el desarrollo del páncreas endocrino, aumentando la proliferación y la supervivencia de las células β pancreáticas inmaduras, lo que se traduce en un aumento de las células productoras de insulina (Rachdi *et al.*, 2003). En segundo lugar, varias investigaciones han mostrado el efecto insulínico de VIP, promoviendo la secreción de insulina en las células β pancreáticas (Bertrand *et al.*, 1996; Filipsson *et al.*, 1998; Jamen *et al.*, 2002). En

este mismo sentido, se ha descrito que la sobreexpresión VIP en tales células da lugar a niveles de glucosa en suero bajos y una elevada producción de insulina (Kato *et al.*, 1994). Al contrario, ratones deficientes para VIP muestran elevados niveles de glucosa (Martin *et al.*, 2010). Así mismo, corroborando los hallazgos obtenidos para VIP, se ha observado que diferentes agonistas de VPAC₂ promueven la biosíntesis y la secreción de insulina (Tsutsumi *et al.*, 2002; Giordanetto *et al.*, 2013).

En relación a la **inflamación**, VIP es capaz de modular tanto las respuestas inmune innata como la adaptativa que se establecen durante el desarrollo de la T1D (véase *Figura 34*). Varios trabajos han mostrado el efecto de VIP sobre la producción de mediadores inflamatorios por parte de las células de ambos sistemas. En este sentido se ha descrito que VIP inhibe la producción de ON, TNF α e IL-12, a la vez que promueve la producción de PGE2 e IL-10 en los macrófagos activados de ratones NOD (Larocca *et al.*, 2007). Además, VIP reduce la producción de IL-12 y aumenta la producción de TGF β de los linfocitos Th procedentes de ratones diabéticos (Herrera *et al.*, 2006; Rosignoli *et al.*, 2006). Por otra parte, al mismo tiempo que regula la secreción de mediadores inflamatorios, VIP es capaz de modular las poblaciones Th de los ratones NOD. En este sentido se ha puesto de manifiesto que VIP regula el balance Th1/Th2 promoviendo la respuesta Th2 e inhibiendo la de tipo Th1 (Herrera *et al.*, 2006; Rosignoli *et al.*, 2006). Además, VIP induce la respuesta de las células Treg en estos ratones (Rosignoli *et al.*, 2006). Todo ello conduce a la regulación de los balances entre las subpoblaciones Th favoreciendo la respuesta anti-inflamatoria.

Figura 34. Acciones biológicas de VIP en la diabetes autoinmune.



Nota: Resumen de los principales factores y tipos celulares modulados por VIP durante la respuesta inflamatoria desencadenada en los islotes pancreáticos en la T1D. El color azul indica *Inducción* y el color rojo *Inhibición*.

A pesar de que aún no se han realizado ensayos clínicos al respecto, la habilidad de VIP para modular las diferentes subpoblaciones Th, inhibir la producción de mediadores inflamatorios y promover la producción de insulina, hacen de este neuropéptido un candidato idóneo para el **tratamiento** de pacientes diabéticos.

Objetivos

En los últimos años, nuestro grupo y otros grupos de investigación han demostrado ampliamente el gran potencial terapéutico de este neuropéptido en numerosas enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. El efecto beneficioso que ejerce VIP sobre estas patologías se consigue gracias a múltiples mecanismos, entre los cuales se encuentran sus acciones biológicas sobre los linfocitos T. Respecto a esta población celular, nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el análisis de los efectos de VIP y la expresión de sus receptores en los linfocitos T. Un subtipo de linfocito T lo constituye la subpoblación Th17. Tras su descubrimiento se ha destacado ampliamente su implicación en numerosas enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. En base a estos hallazgos, el análisis del efecto de VIP sobre esta subpoblación linfoide presenta amplias proyecciones en relación al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para este tipo de enfermedades.

En este marco de investigación, los objetivos concretos de la presente Tesis Doctoral son:

- 1. Estudiar el efecto de VIP sobre la activación de las células memoria Th17 y otras subpoblaciones T CD4 murinas y humanas.**
 - 1.1. Analizar el efecto de VIP sobre la generación de diferentes respuestas Th murinas tras la activación *in vitro* de linfocitos T CD4 procedentes de ratones Balb/c.
 - 1.2. Caracterizar la expresión de los receptores VPAC₁ y VPAC₂ en las células memoria Th humanas procedentes de sangre periférica de donantes sanos tras su activación *in vitro*.
 - 1.3. Estudiar el efecto de VIP sobre el fenotipo de células memoria humanas Th17 y otras subpoblaciones T CD4 activadas *in vitro*.
- 2. Analizar el efecto de VIP sobre la diferenciación de las células Th17 humanas a partir de linfocitos naïve T CD4 procedentes de cordón umbilical de donantes sanos.**
 - 2.1. Caracterizar la expresión de los receptores VPAC₁ y VPAC₂ en las células Th durante su diferenciación *in vitro* hacia el subtipo Th17.
 - 2.2. Evaluar el fenotipo de las células Th17 diferenciadas *in vitro* en la presencia de VIP.
- 3. Examinar el efecto de VIP sobre la polarización hacia la subpoblación Th17 de las células memoria T CD4 humanas procedentes de sangre periférica de donantes sanos.**
 - 3.1. Caracterizar la expresión de los receptores VPAC₁ y VPAC₂ en las células Th polarizadas *in vitro* hacia el subtipo Th17.
 - 3.2. Evaluar el efecto de VIP sobre el fenotipo de células memoria humanas Th polarizadas *in vitro* hacia la subpoblación Th17.
- 4. Determinar el efecto de VIP *in vivo* sobre las diferentes subpoblaciones T CD4 en el modelo experimental de diabetes autoinmune NOD.**

5. Analizar el efecto de VIP sobre las células memoria Th17 y otras subpoblaciones Th humanas procedentes de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide temprana.

- 5.1. Estudiar las respuestas Th17, Th17/1 y Treg/Th17 de los linfocitos Th memoria tras su activación, y tras su polarización hacia Th17 *in vitro* en pacientes con artritis reumatoide temprana comparando con donantes sanos.
- 5.2. Caracterizar la expresión de los receptores VPAC₁ y VPAC₂ en las células Th durante su activación y polarización hacia Th17 *in vitro*.
- 5.3. Evaluar el efecto de VIP sobre el fenotipo de células memoria Th17 y otras subpoblaciones T CD4 activadas *in vitro*.
- 5.4. Determinar el efecto de VIP sobre el fenotipo de células memoria Th polarizadas *in vitro* hacia la subpoblación Th17.

Artículos

Artículo 1

Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells.

Rebeca Jimeno, Javier Leceta, Carmen Martínez, Irene Gutiérrez-Cañas, Selene Pérez-García, Mar Carrión, Rosa P Gomariz, Yasmina Juarranz.

Immunology and Cell Biology, 2012, 90(2): 178-186.

ORIGINAL ARTICLE

Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells

Rebeca Jimeno¹, Javier Leceta¹, Carmen Martínez², Irene Gutiérrez-Cañas¹, Selene Pérez-García¹, Mar Carrión¹, Rosa P Gomariz¹ and Yasmina Juarranz¹

CD4T helper cells are decisive in the struggle against pathogens and in maintaining immune homeostasis. Nevertheless, they also drive immune-mediated disease. Recently, emerging evidence suggests that seemingly committed Th cells possess plasticity and may convert into other types of effector cells. Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) is an immunomodulator neuropeptide, which is able to promote or inhibit individually the differentiation or function of some T-helper subsets. We conducted *ex vivo* study with erythrocyte-depleted spleen cells from healthy mice to check the balance between cytokines and master regulators of different T-helper subsets. This neuropeptide adversely affected the differentiation and functionality phases of Th17 cells and had a negative influence on cytokines related to Th1 function, increasing Th17 cells over those of the Th1 cell subset. With respect to Th2 subsets, VIP augmented the interleukin (IL)-4/IL-9 mRNA ratio, and a negative correlation between IL-4 and IL-9 was observed in culture supernatants. VIP augmented Th2 relative to Th1 in cell subsets. VIP decreased the iTreg/Th17 balance. Regarding the induced T-regulatory (iTreg)/Th1 balance, VIP increased the presence of immunoregulatory cytokines in relation to IFN γ . Although additional studies are needed to clarify the role of VIP on the balance between cytokines and master regulators during T-helper differentiation, our data show that VIP reduces Th17/Th1 and Th1/Th2 ratios. However, the iTreg/Th17 ratio was differently counterbalanced, probably because of culture conditions. Finally, this is the first study showing that VIP also modulates Th2/Th9 and iTreg/Th1 ratios.

Immunology and Cell Biology (2012) 90, 178–186; doi:10.1038/icb.2011.23; published online 29 March 2011

Keywords: master regulators; signature cytokines; T-cell subsets; vasoactive intestinal peptide

Innate and adaptive immunity are the major elements in the immune system. CD4T cells (effector or T-helper cells) have critical roles during adaptive immune responses, as they help B cells to make antibodies and they recruit CD8T cells, macrophages, mast cells, neutrophils, eosinophils, basophils and other effector cells. Their cytokine secretion patterns, together with the tissue location, decide the diverse functions of these cells. So far, following their expression of specific transcription factor (master regulators), their cytokine secretion pattern and their function, naïve CD4T cells can differentiate into four major lineages: Th1, Th2, Th17 and induced T-regulatory (iTreg) cells, although other Th lineages could be regarded as subsets (follicular helper T cells (T_{FH}), Th9 or Th22).^{1–8} Classically, T-bet (Th1), GATA-3 (Th2), ROR γ t (Th17) and Foxp3 (Treg) are the main master regulators for each Th subset that produce a pattern of cytokines in response to their activation. Lastly, recent emerging evidence suggests that under certain conditions, seemingly committed Th cells possess plasticity and may convert into other types of effector cells.^{3,7,9,10} With respect to this, several plasticity modes of T-cell

subsets have recently been described between iTreg and Th17, Th1 and Th17, iTreg and Th1 or Th2 and Th9. Mechanisms that have power over the plasticity of CD4T cell subsets comprise cellular conditions, clonality, transcriptional circuitry and chromatin modifications.^{3,11}

Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), a neuropeptide that is widely distributed in the central and peripheral nervous system, is produced by several endocrine and immune cells, including T cells. This neuropeptide functions through binding to its specific receptors, VIP and PACAP receptor type I (VPAC₁) and VIP and PACAP receptor type II (VPAC₂) that belong to class II of G-protein-coupled receptors.^{12–18} VIP is one of the best-studied immunoregulatory peptides that can modulate both innate and adaptive immunity, showing a predominantly anti-inflammatory function. It is perhaps noteworthy that *in vivo* data indicate that VIP treatment may have promising outcomes in the treatment of inflammatory and autoimmune disease such as septic shock, rheumatoid arthritis, autoimmune diabetes, Sjögren's syndrome, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease.^{13–15,18–22}

¹Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain and ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence: Dr Y Juarranz, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, c/José Antonio Novais 2, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: yashina@bio.ucm.es

Received 9 December 2010; revised 16 February 2011; accepted 20 February 2011; published online 29 March 2011

What otherwise is known about the effect of VIP on the different CD4T cell subsets? It is well known that it decreases Th1 responses, increases Th2 response, regulates Th17 differentiation and promotes T-regulatory functions in both *in vivo* and *in vitro* studies.^{13–15,23–29} Notably, all these studies have been conducted considering the effect of VIP on one or two T-cell subsets but not all at once. Nevertheless, taking into account new data about the plasticity and heterogeneity of T-cell subsets, it is important to reconsider the VIP effect on different T-cell subsets, examining the balance between cytokine production and master regulators from each T-helper subset more closely. In this study, we have recently demonstrated that VIP decreases the Th1/Th17 and Th1/Th2 ratios and switches the Tregs/Th17 ratio that counterbalances tolerance and immunity during the development of autoimmune diabetes.³⁰

Given the discrepancy that sometimes exists between *in vivo* and *in vitro* studies, the main objective of this work was to evaluate in activated murine T cells from healthy mice *ex vivo*, the balance between cytokine production and master regulators from each of the classic T-helper subsets after VIP treatment, analyzing the Th1/Th17, Th1/Th2, Th2/Th9, iTreg/Th17 and iTreg/Th1 ratios.

RESULTS

VIP lowers the number of viable cells throughout culture days

We carried out MTT assay in order to determine whether the VIP treatment affects cell growth/survival during culture days (Figure 1a). After isolation, erythrocyte-depleted spleen cells from healthy mice were activated with anti-CD3- and anti-CD28-coated beads, and the number of viable cells increased over resting values (non activated) throughout the culture periods. Treatment with 10 nM of VIP significantly decreased the number of viable cells on days 2, 3 and 5 of culture.

Analysis of cell populations in cultures after VIP treatment

Taking into account the different immune cells present in the culture, we carried out flow cytometry assays. The activation with anti-CD3- and anti-CD28-coated beads resulted in an increase of T lymphocytes over the other cells present in the culture on day 5 relative to day 1. The T lymphocyte/other cells ratio augmented 1.78-fold in resting condition (non activated), whereas it increased 11.90-fold in activated condition (data not shown). Treatment with VIP increased the percentage of CD8⁺ T lymphocytes. A slight reduction in CD19⁺ on day 2 was observed after VIP treatment, whereas nonsignificant effect was detected on CD4⁺, CD11c⁺ and CD11b⁺ cells (Figure 1b).

VIP effect on cytokines related to the stabilization/functionality of the Th17 cell subset

Previous reports using animal models of inflammatory/autoimmune disease demonstrate that VIP treatment interferes with the functional phase of Th17 cells in non-obese diabetic (NOD) mice, and decreases interleukin (IL)-17 and IL-23 cytokine expression in a collagen-induced arthritis model.^{25,30,31} On the other hand, previous *in vitro* studies show that VIP induces Th17-like differentiation through VPAC1 receptor.²⁹ To solve this discrepancy, we studied the production of cytokine involved in the differentiation (IL-6 and transforming growth factor (TGFβ1)), stabilization/amplification (IL-23) and function (IL-17, IL-22, IL-21 and tumor necrosis factor (TNFα)) of the Th17 subset,³² although IL-21 has also been shown to participate in the differentiation/amplification of Th17 cells.¹ The presence of VIP in the culture did not modify IL-6 levels. However, it significantly increased the levels of TGFβ1 on day 5 and the presence of IL-23 in culture supernatants on day 3 (Figure 2). When we checked the

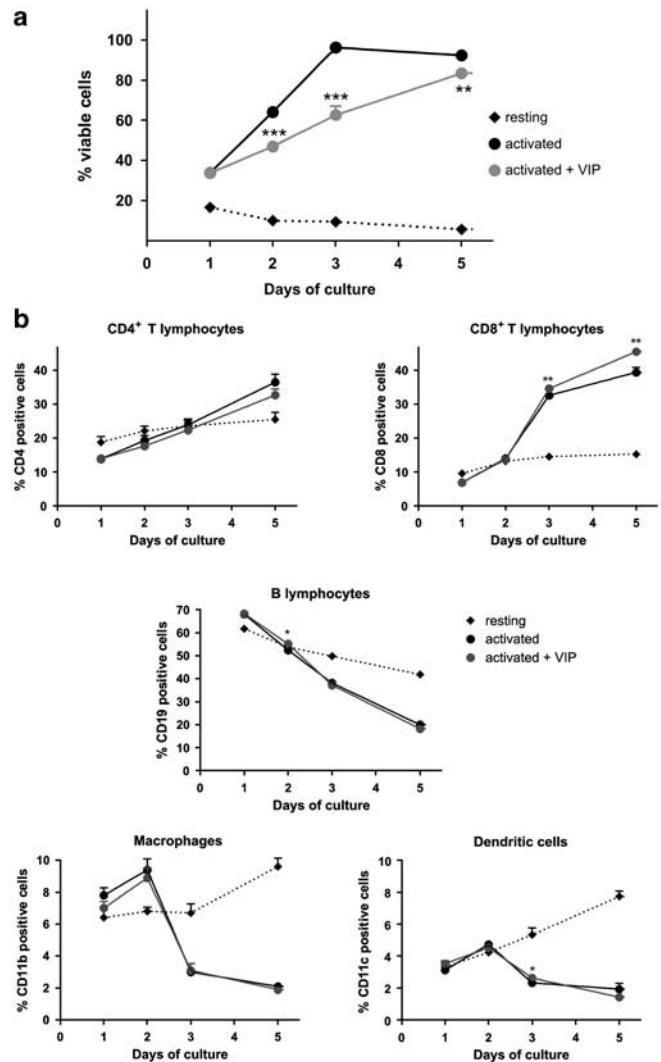


Figure 1 Effect of VIP on growth/survival of erythrocyte-depleted spleen cells present throughout the culture days and analysis of cell populations in the culture and effect of VIP treatment. (a) Quantization of live cells using MTT assay was performed as described under methods section. Number of viable cells was analyzed on days 1, 2, 3 and 5 of culture in resting, activated (treated with anti-CD3/anti-CD28-coated beads plus rIL-2) and activated plus VIP conditions. Results are the percentage of the absorbance compared with activated cells at day 5 of culture ($A_{570}=1.140 \pm 0.039$) and represent the mean of four separate experiments conducted in triplicate. (b) Cell suspensions from resting, activated and activated plus VIP cultures were collected on days 1, 2, 3 and 5 and processed for immunofluorescence staining as described under methods section. FITC-conjugated rat anti-mouse CD11b and FITC-conjugated Armenian hamster anti-mouse CD11c were used to detect mainly macrophages and dendritic cells, respectively. Lymphocytes were labeled with phycoerythrin-conjugated rat anti-mouse CD4 and FITC-conjugated rat anti-mouse CD8. And, finally, FITC-conjugated rat anti-mouse CD19 were used to detect B lymphocytes. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. Data are the mean \pm s.e.m. of two different experiments conducted in triplicate. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

cytokines produced by Th17 cells in culture supernatants, we observed that VIP treatment significantly reduced the presence of IL-17, IL-22 and TNFα (Figure 2). Thus, VIP could have a negative effect on Th17 differentiation by increasing TGFβ1 production on day 5; in contrast,

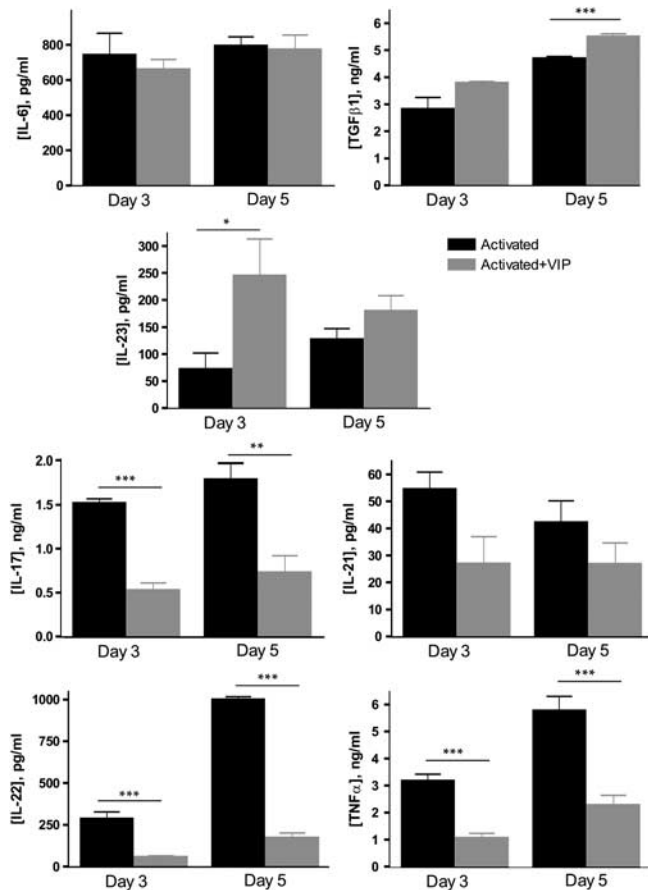


Figure 2 VIP effect on cytokines typically relate to the stabilization/ functionality of Th17 cell subset. Protein expression of IL-6, TGFβ, IL-23, IL-17, IL-21, IL-22 and TNFα was analyzed in culture supernatants by ELISA test on days 3 and 5 of culture as described in under methods section. Data are the mean ± s.e.m. of six different samples. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

the increase in IL-23 levels by day 3 could reflect an increase in stabilization of Th17 cells. In conclusion, VIP adversely affects differentiation and functionality of T cell, and perhaps its amplification via IL-21.

VIP effect on cytokines related to the differentiation/functionality of the Th1 cell subset

An increasing body of data show that VIP decreases cytokine and Th1 transcription factor, in both *in vivo* and *in vitro* studies.^{13–15,21,24,28,33} In this study IL-12p70 is the cytokine involved in Th1 differentiation and interferon γ (IFN γ) is produced mainly by effector Th1 cells,^{8,34} although other cytokines, such as TNF α , can be produced by this subset.³ Figure 3a shows that VIP-affected cytokines involved in differentiation/functionality of Th1 cells differently, as IL-12p70 was slightly augmented and IFN γ (Figure 3a) or TNF α (Figure 2) decreased significantly after VIP treatment. Thus, VIP has a negative influence on cytokines related to Th1 function.

VIP enhances the balance between cytokines and transcription factors of Th17 and Th1 subsets: analysis of the Th17/Th1 ratio
Th1 and Th17 are involved in the pathogenesis of many inflammatory and autoimmune disorders, but which of the two subsets is more

important in these pathologies is unclear. In addition, *in vivo* and *in vitro* studies show plasticity from Th17 towards Th1 subsets.^{3,7,35,36} Thus, beyond studying the VIP effect on individual T-helper subsets, it could be more enlightening to study the balance between Th17/Th1 subsets. With respect to this, our previous studies show that treatment with VIP increased the Th17/Th1 ratio in NOD mice, whereas it was decreased with the development of autoimmune diabetes in untreated NOD mice.³⁰ Analysis of protein levels indicated that there is a positive correlation ($r=0.99$, $P < 0.001$) between IL-17 and IFN γ levels in the supernatants of activated culture cells in absence of VIP treatment (data not shown). On the other hand, the ratio between the expression of transcription factors that commit to Th17 (ROR γ t) and Th1 (T-bet, encoded by *Tbx21*) increased significantly in the presence of VIP in activated culture cells on days 3 and 5 (Figure 3b). IL-12 comprises the IL-12p35 and IL-12p40 subunits and shares the latter with IL-23. In this study, the IL-23p19/IL-12p35 mRNA ratio was also augmented in the presence of VIP (Figure 3b). The mRNA expression ratio between IL-17 and IFN γ , the signature cytokines for Th17 and Th1, respectively, also showed the same result described above in the presence of VIP (Figure 3b). Hence, the presence of VIP increased the cytokines and transcription factors typically related to Th17 cells over those of the Th1 cell subset in activated erythrocyte-depleted spleen cells.

VIP influence on cytokines related to the differentiation/ functionality of the Th2 cell subset

VIP has been widely reported to increase levels of cytokines and Th2 transcription factor, in both *in vivo* and *in vitro* studies,^{13–15,21,24,28,33} here, mRNA expression of GATA3 was increased in the cell culture after VIP addition. GATA3 mRNA expression relative to β -actin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) values on day 5 for activated and activated plus VIP cells were 1.42 ± 0.28 and 1.95 ± 0.30 , respectively (no significant data). IL-4, the signature cytokine for Th2, showed the same mRNA expression pattern as GATA3. IL-4 mRNA expression relative to β -actin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) values on day 5 for activated and activated plus VIP cells were 0.09 ± 0.01 and 0.24 ± 0.03 , respectively (** $P < 0.001$). Nevertheless, the addition of VIP to the culture resulted in a decrease in the culture supernatants of IL-4 and IL-10, cytokines produced, in other cells, by Th2 subsets (Figure 4a).

A population of IL-9-producing cells has recently been described, deriving from Th2 cells in response to TGFβ1 in the presence of IL-4 (refs 6, 37). This finding may represent an example of Th2 plasticity. To check whether this event occurred in our studies, we measured IL-9 mRNA expression by quantitative real-time PCR and studied the balance between IL-4 and IL-9 expressions (Figure 4b, left). The presence of VIP in these activated cultures significantly increased the IL-4/IL-9 mRNA expression ratio. We examined the correlation between both cytokines in culture supernatants (Figure 4b, right). Although there was a positive correlation ($r=+0.90$) between IL-4 and IL-9 in activated cultures, a negative correlation ($r=-0.10$) between both was observed in presence of VIP. Thus, VIP could have a negative influence, at least within these culture conditions, on the possibility that Th2 can 're-program' to become IL-9-producing cells (Th9).

VIP reduces the balance between cytokines and transcription factors of Th1 and Th2 subsets: analysis of the Th1/Th2 ratio

The Th1/Th2 paradigm has been the subject of intense investigation in inflammatory/autoimmune pathologies. Figure 4c shows that the presence of VIP in these cultures results in a decrease in T-bet (*Tbx21*)/GATA3 transcription factor ratio on day 5 and in the IFN γ /IL-4 cytokines ratio on days 3 and 5. These data confirm that VIP increases Th2 relative to Th1 cell subsets.

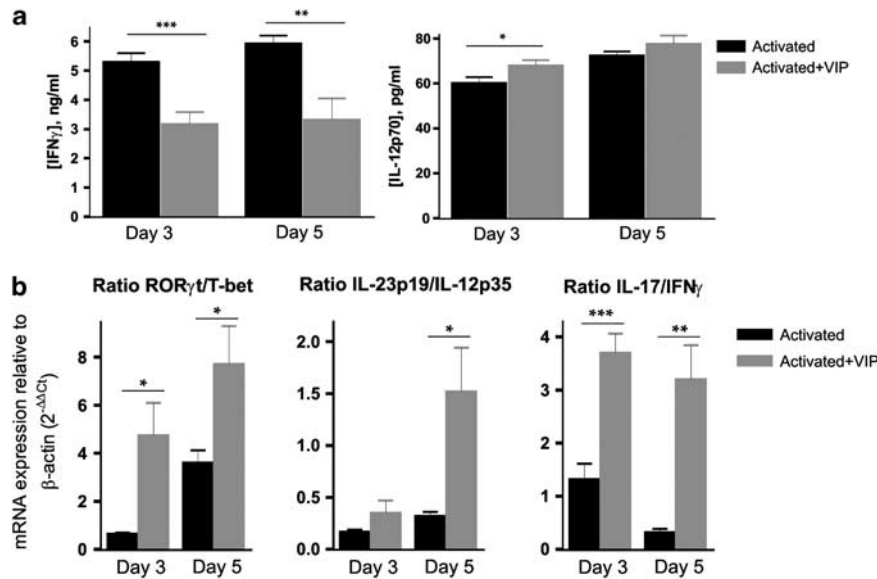


Figure 3 VIP effects on cytokines typically relate to the Th1 cell subset and on the Th17/Th1 cell subsets ratio. (a) Protein expression of IFN γ and IL-12p70 was analyzed in culture supernatants by ELISA test on days 3 and 5 of culture as described under methods section. Data are the mean \pm s.e.m. of six different samples. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (b) mRNA expression of ROR γ t, T-bet, IL-23p19, IL-12p35, IL-17 and IFN γ was determined by real-time PCR on days 3 and 5 of culture as described under methods section. The ratios between mRNA expression of ROR γ t/T-bet, IL-23p19/IL-12p35 and IL-17/IFN γ are shown. Data are the mean \pm s.e.m. of six different samples. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

VIP modulates the proportion of CD4⁺CD25⁺ cells and immunoregulatory cytokines

Although very high expression of IL-2R α (CD25) is achieved upon activation of conventional T cells *in vitro*, this expression is highly transient and the IL-2R α ^{low} phenotype is associated with effector T cells. In contrast, the IL-2R α ^{high} phenotype marks Treg cells.^{38,39} Figure 5a shows that the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells increased between days 3 and 5 of culture. However, the percentage of double-positive cells cultured in the presence of VIP was significantly decreased on day 5 (Figure 5a, upper). The mRNA expression of Foxp3, which is closely associated with the suppressive function of CD4⁺CD25⁺ cells, increased in the same manner as these double-positive populations in activated cells (Figure 5b). The presence of VIP in the culture increased the mRNA expression of the transcription factor of this Treg on days 1 and 3 but, however, it decreased its expression on day 5, according to the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells obtained. TGF β is an important mediator of induced Treg (iTreg) cell production, and together with IL-10, is considered an immunoregulatory cytokine.⁴⁰ VIP increased the levels of TGF β 1 (Figure 2), but nonetheless decreased the levels of IL-10 in culture supernatants (Figure 4a). Thus, the presence of VIP in these culture conditions (with recombinant mouse IL-2) could reduce the proportion of iTreg in activated erythrocyte-depleted spleen cell cultures, although TGF β 1 was augmented.

The presence of IL-2 in the culture medium has previously been described to bypass VIP suppressor activity of human regulatory T cells.²⁷ To try to explain the discrepancies between the results presented in this paper and previous studies, in which VIP promotes the generation of regulatory T cells, we cultured activated erythrocyte-depleted spleen cells in the presence of VIP and without IL-2. In this case, VIP notably increased the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells on day 5 of culture (10.6 \pm 0.55 and 30.7 \pm 1.60 for activated and activated plus VIP, respectively). Foxp3 mRNA expression was also increased by

VIP, but not significantly (data not shown). Consequently, the absence of IL-2 in the culture medium was crucial for the generation of CD4⁺CD25⁺ cells by VIP.

VIP decreases the balance between cytokines and transcription factors of iTreg and Th17 subsets: analysis of the iTreg/Th17 ratio

As in previous cases, it is interesting to study the balance between iTreg and Th17 cells, as iTreg cells may be able to convert into Th17 cells.^{3,7,9,34} It has been previously demonstrated that VIP increases this balance *in vivo* using NOD mice as models of inflammation and autoimmunity.³⁰ We checked the ratio between transcription factors for both Th subsets and the cytokines involved in their differentiation. Figure 6a shows that VIP notably decreased the Foxp3/ROR γ t and TGF β 1/IL-6 mRNA expression ratios on days 3 and 5 of cell culture. Analysis of balance between the two immunoregulatory cytokines (TGF β 1 and IL-10) and IL-17 indicated that VIP significantly increased the TGF β 1/IL-17 mRNA expression ratio. However, in contrast, no differences were observed in the IL-10/IL-17 ratio between activated and activated plus VIP cell cultures. All these results show that VIP decreases the *ex vivo* iTreg/Th17 balance in activated erythrocyte-depleted spleen cells.

VIP modulates the balance between cytokines and transcription factors of iTreg and Th1 subsets: analysis of the iTreg/Th1 ratio

Recent findings suggest that Treg cells are able to convert *in vitro* into Th1 subset under certain conditions, such as a high dose of exogenous IL-2 (refs 3, 7, 41). With regard to the plasticity between these Th subsets and our culture conditions, we checked the VIP effect on the balance between iTreg and Th1 cells. Our results show that VIP decreased the Foxp3/T-bet mRNA expression ratio (Figure 6b). On the other hand, the balances between the immunoregulatory cytokines (TGF β 1 and IL-10) and IFN γ were notably augmented in the presence of VIP in these activated cell cultures on days 3 and 5. This means that,

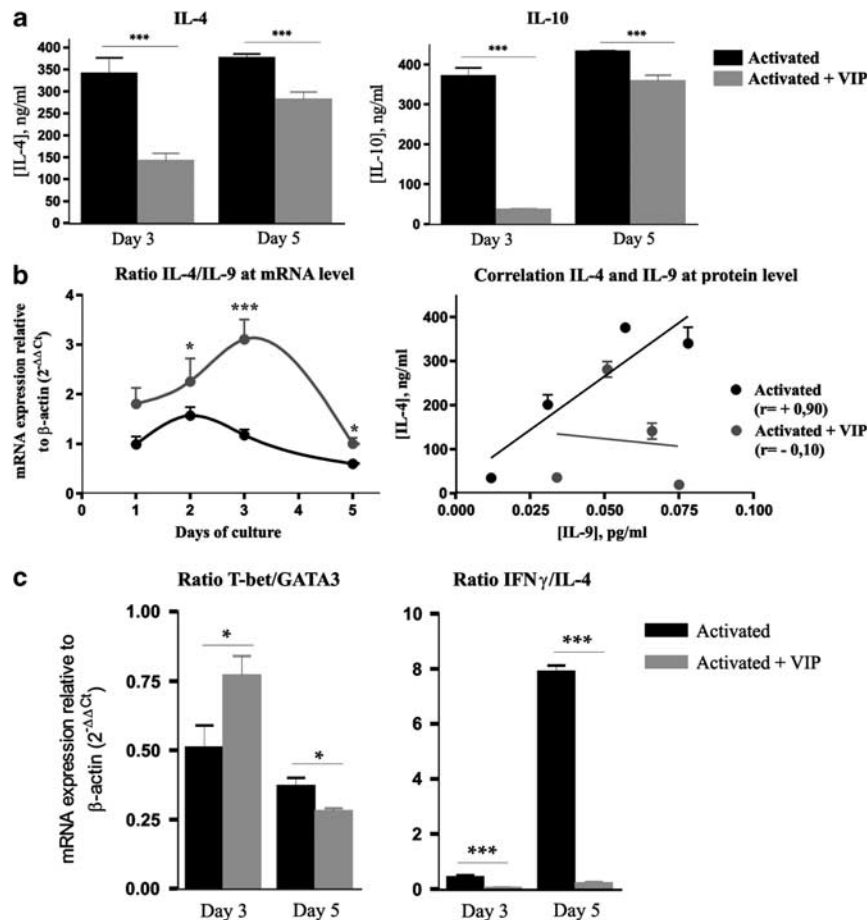


Figure 4 VIP effects on cytokines typically relate to the Th2 cell subset and on the Th1/Th2 cell subsets ratio. (a) Protein expression of IL-4 and IL-10 was determined in culture supernatants by ELISA test on day 3 and 5 of culture as described under methods section. mRNA expression in activated and activated plus VIP cells are shown. (b) (left): mRNA expression of IL-4 and IL-9 was determined by real-time PCR on day 1, 2, 3 and 5 of culture. The ratios between mRNA expressions of IL-4/IL-9 throughout cell culture are shown. (b) (right): Protein expression of IL-4 and IL-9 was determined in culture supernatants by ELISA test on days 1, 2, 3 and 5. Correlations between both cytokines are shown, correlation values were $r=+0.90$ and $r=-0.10$ for activated and activated plus VIP, respectively. (c) mRNA expression of T-bet, GATA3, IFN γ and IL-4 was determined by real-time PCR on day 3 and 5 of culture. The ratios between mRNA expression of T-bet/GATA3, IFN γ /IL-4 are shown. In all cases, data are the mean \pm s.e.m. of six different samples. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant; * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

at least where cytokines are concerned, VIP increases the presence of iTreg in relation to Th1 cells.

DISCUSSION

The effects of VIP have been extensively studied because of its clearly demonstrated function on innate and adaptive immunity, having a beneficial effect on the development of several autoimmune disorders. In this study we aimed to extend knowledge of the VIP effect on CD4T cells. We focused on the effects of VIP on different CD4T subsets, given the fact that different subsets have several roles in the development of autoimmune and inflammatory disorders, as well as in immune regulation.

For this purpose we tried to choose an *ex vivo* T-helper differentiation model from healthy mice without polarization conditions and with the presence of other immune cells such as B lymphocytes, macrophages or dendritic cells, thus trying to reproduce an *in vitro* model as close as possible to an *in vivo* model. This meant that initially we had to review the viability and the different cell types present in the culture of activated erythrocyte-depleted spleen cells as compared with cultures that had no VIP. It is the case that VIP decreased the viability

of these cells when compared with cultures that had no VIP, according to previous papers that describe the inhibition of proliferation of mouse T cell and induction cell-cycle arrest in allogenic-activated human T cells.^{27,42} As expected, the proportion of T lymphocytes was increased after activation, whereas B lymphocytes, macrophages and dendritic cells decreased throughout cell culture. VIP reduced the percentage of CD4⁺ cells but significantly increased that of CD8⁺ cells on day 5. The first result has previously been described but nonetheless little is known about VIP and CD8T cell proliferation, showing that VIP decreased CD8T cell proliferation.^{27,43} More studies are needed to clarify this discrepancy but different culture conditions may explain it.

Although T cells preferentially express lineage-defining transcription factors and produce signature cytokines, new insights suggest that it is probably more accurate to view the process of Th cell differentiation in the framework of varying ratios of master regulators and signature cytokines, expression of which is regulated by an array of extrinsic and intrinsic factors. In fact, this regulated expression is probably the reason why several modes of plasticity of T-cell subsets have been described between iTreg and Th17, Th1 and Th17, iTreg and

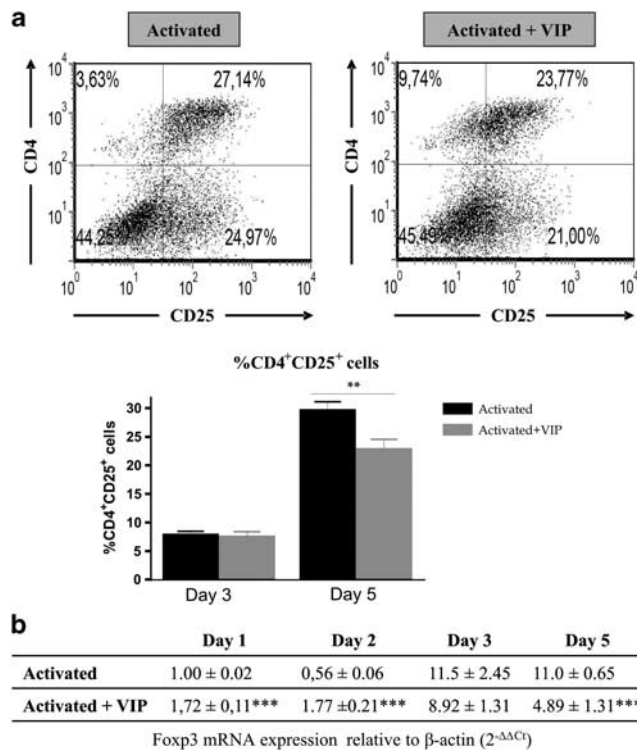


Figure 5 VIP decreases CD4⁺CD25⁺ T-cells percentage and Foxp3 mRNA expression. **(a)** Flow-cytometry analysis of CD4⁺CD25⁺ T cells was carried out on cell suspensions from activated and activated plus VIP cultures on days 3 and 5. Cells were stained with phycoerythrin-conjugated rat anti-mouse CD4 and FITC-conjugated rat anti-mouse CD25 monoclonal antibodies, and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. The indicated proportion of positive cells was determined in the gate of lymphocytes based on forward scatter versus side scatter parameters. A representative example (above) and the mean of double-positive cells (down) are shown. **(b)** Foxp3 mRNA expression was determined by real-time PCR on day 1, 2, 3 and 5 of cell culture. mRNA expressions in activated and activated plus VIP cells are shown. Data are the mean \pm s.e.m. of six different samples. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Th1, and Th2 and Th9 (Supplementary Figure). Thus, stability should certainly not be assigned to each T-helper subset on the basis of the presence of a transcription factor or the production of cytokine; in fact, it may be safer to view cytokine-producing subsets in probabilistic terms.⁹

The first paradigm for T-helper functional diversification was the description of Th1 and Th2 CD4 effector subsets.² Thereafter, the VIP effect on the Th1/Th2 balance has largely been studied in both *in vivo* and *in vitro* studies.^{13–15,23,24,28,30,44} The results presented here confirm that VIP increases cytokines and master regulators for Th2 relative to those of the Th1 cell subset. Although a decrease of Th1 cytokine signature was observed, IL-12p70 was increased after VIP treatment on day 3. VIP decreased IL-12p70 in different inflammatory/auto-immune animal models.^{13,15,21,33} Regarding to *in vitro* studies, VIP inhibited IL-12 production in LPS-stimulated macrophages,⁴⁵ and however, induced IL-12p70 secretion by dendritic cells.⁴⁶ In these *ex vivo* studies, cells and conditions of culture are different. On the other hand, previous studies show that Th2 cells may become a population of IL-9-producing cells.^{6,37} This population, named Th9, promotes *in vivo* tissue inflammation.³⁷ It is unclear whether IL-9 producers

should be considered a new subset, to be called Th9, or whether expression of this cytokine reflects adaptation of Th2 cells to a change in the microenvironment.³ The results presented here represent an initial study of the effect of VIP upon the Th2/Th9 balance, showing a negative correlation between IL-4 and IL-9 supernatant levels in these cultures and also on the possibility that Th2 cells could 're-program' to become IL-9-producing cells (Th9).

The influence of VIP on cytokines and master regulators of Th17 cells has been also studied. Although VIP decreased cytokines related to Th17 in several animal models of inflammatory/autoimmune disease,^{23,25,30,44} an *in vitro* study showed that VIP in the presence of TGF β induces differentiation of Th17 cells from mouse CD4T cells.²⁹ In the present results, VIP could interfere in differentiation and inhibit the functionality phase of Th17 cells. The discrepancies between this *ex vivo* study and previous observations could be a reflection of different culture conditions such as the company of other immune cells and the presence of IL-2 in the culture medium.²⁹ On the other hand, the main results presented in this article correspond to cultures in the co-presence of VIP and TGF β but not with VIP alone. It has been long described that TGF β is necessary for Th17 cell differentiation. Results presented by Yadav *et al.*²⁹ showed no increase of IL-17 and IL-22 levels when CD4T cells were cultured in the presence of VIP alone, corroborating our results.

In vitro Th17 differentiation shows a STAT4- and T-bet-dependent plasticity towards a Th1 profile in mice and humans.^{3,9} The evidence increasingly points to the conversion of Th17 cells into Th1 cells, as being more important for the pathogenesis of autoimmune disorders.^{35,36} Our *ex vivo* results confirm those previously observed in studies in NOD mice,³⁰ demonstrating that the presence of VIP in activated erythrocyte-depleted spleen cells increases cytokines and master regulators typically related to Th17 cells over those of the Th1 cell subset.

The effects of VIP on the master regulator and immune cytokines of iTreg subsets were surprising. In contrast to what has previously been described using *in vivo* and *in vitro* autoimmune/inflammatory models,^{15,23,27,30,47} the presence of VIP in activated erythrocyte-depleted spleen cells cultures could reduce the proportion of CD4⁺CD25⁺ cells and Foxp3 mRNA expression, associated with iTreg. These discrepancies could be explained by the presence of IL-2 in the culture medium. Results on activated cells show that the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells on day 5 decreased from 29.6 ± 1.53 in the presence of IL-2 to 10.6 ± 0.55 when IL-2 was not present in culture medium. These results are consistent with previously described findings³⁸ that IL-2 is necessary for iTreg differentiation. However, its presence somehow affects the role of VIP on *in vitro* iTreg generation²⁷ and these results.

Another described model of plasticity of T-cell subsets is the transformation of iTreg in Th17 cells. Thymus-derived Treg cells have stable Foxp3 expression, but iTreg cells generated *in vitro* are unstable.⁴⁸ Two cytokines with opposite effects, TGF β and IL-6, cooperate to induce the differentiation of Th17 cells. However, TGF β alone drives the conversion of naïve T cells into Foxp3⁺ Treg. Thus, an inflammatory environment tilts the balance between iTreg and Th17 differentiation. VIP decreased mRNA expression of Foxp3/ROR γ t and TGF β /IL-6 balance. Nevertheless, mRNA expression between cytokines related to both subsets, IL-10/IL-17 and TGF β /IL-17, did not show this pattern after VIP treatment. This means that VIP decreases the iTreg/Th17 ratio in activated erythrocyte-depleted spleen, contrary to previous *in vivo* results in CIA-model and NOD mice.^{23,30} The Foxp3/ROR γ t mRNA expression ratio increased in the absence of IL-2 on day 5 of culture (data not

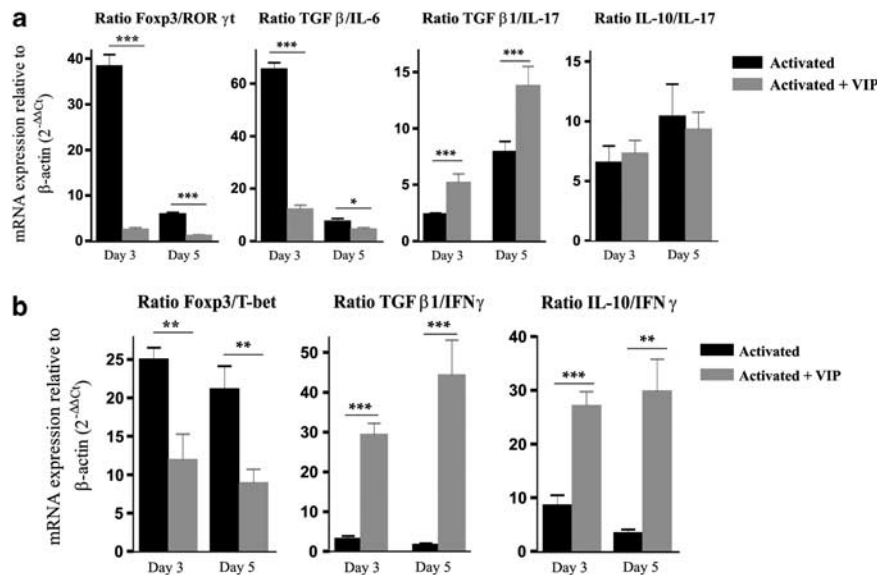


Figure 6 VIP modulates the iTreg/Th17 and iTreg/Th1 balances in a different way. mRNA expression of Foxp3, ROR γ t, Tbx21 (T-bet), TGF β , IL-6, IL-10, IL-17 and IFN γ was determined by real-time PCR on days 3 and 5 of cell culture. (a) For iTreg/Th17 balance, the ratios between mRNA expressions of Foxp3/ROR γ t, TGF β 1/IL-6, TGF β 1/IL-17 and IL-10/IL-17 are shown. (b) For iTreg/Th1 balance, the ratios between mRNA expressions of Foxp3/T-bet (Tbx21), TGF β 1/IFN γ and IL-10/IFN γ are shown. Data are the mean \pm s.e.m. of six different samples. Differences between activated and activated plus VIP conditions were statistically significant; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

shown). This would again be because of the presence of IL-2, as VIP decreased iTreg when IL-2 is present in the culture.

The iTreg subset can be also destabilized *in vitro* by the presence of a high IL-2 concentration and, as a consequence, this T-helper population becomes Th1 subset.^{3,7,41} Taking into account this flexibility or plasticity of iTreg, we checked the effect of VIP on the balance between master regulators and cytokines of iTreg and Th1 subsets. VIP increased the presence of cytokines related to iTreg (IL-10 and TGF β) compared with the signature cytokine for Th1 cells, IFN γ . This effect was not observed at the level of the master regulators of both T-helper subsets.

In view of previous and present findings it is necessary to establish standard culture conditions for examining the VIP effect on *in vitro* T-helper differentiation. In addition, further analyses are needed to determine the mechanisms involved in the VIP effects on T cells described in this study. It is known that VIP exerts its function on these cells through binding to specific receptors, VPAC₁ and VPAC₂. VPAC₁ mRNA expression is higher than VPAC₂ expression in human resting CD4T cells, even though no VPAC₂ mRNA expression appears in mouse resting CD4T cell. The activation of CD4T cells induces downregulation of VPAC₁ and upregulation of VPAC₂ receptor.^{49,50} The study of the VIP receptor pattern on the different subsets analyzed in this work could provide relevant information on the observed effects. On the other hand, as underlying epigenetic mechanisms determine the specificity and plasticity of effector and regulatory T cells,^{3,9,11} additional studies are needed to establish whether VIP somehow affects this framework during T-helper differentiation. Finally, recent studies indicate that flexibility in expression of master regulators and cytokines is relatively common, so it will be more fruitful to consider the VIP effect on their levels and ratios, as they change during the course of immune stimulation. On the other hand, the effect of VIP on one cytokine involved in different T-helper differentiation could have a domino effect on several subsets.

In conclusion, although additional studies are needed to clarify the role of VIP on the balance between cytokines and master regulators during T-helper differentiation, our data using activated erythrocyte-depleted spleen cells from healthy mice as *ex vivo* model show that VIP modulates Th17/Th1 and Th1/Th2 ratios in the same way as in previous *in vivo* studies. However, the iTreg/Th17 ratio was differently counterbalanced, probably because of culture conditions. Finally, this is the first study showing that VIP also affects Th2/Th9 and iTreg/Th1 ratios (Supplementary Figure).

METHODS

Cell cultures

Spleens from healthy 6–10-week-old Balb/c mice were removed and gently minced in a stainless steel sieve. Erythrocyte-depleted spleen cells were seeded in U-bottom 96-wells plates at 1×10^6 cell per ml in RPMI 1640 media (Life technologies, Barcelona, Spain) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Lonza, Verviers, Belgium) and 1% penicillin/streptomycin (Life technologies). Cell cultures were maintained during 5 days at 37 °C in a humidified 5% CO₂ environment. Three types of treatment were established in the culture: resting condition (non activated), activated with anti-CD3- and anti-CD28-coated beads (Life technologies) plus 20 ng ml⁻¹ recombinant mouse IL-2 (eBioscience, San Diego, North America) and activated plus 10 nM VIP (Neosystem, Strasbourg, France).

Cell viability measurement: MTT assay

A colorimetric method was used to estimate cell viability of cultured erythrocyte-depleted spleen cells using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazol (MTT) blue test, as previously described in Gutiérrez-Cañas *et al.*⁴⁹ Briefly, 10 μ l of 0.5 mg ml⁻¹ MTT (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was added to each well. After 4 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ environment and darkness, 0.04N HCl in isopropanol was added to stop formazan production. Absorbance at 570 nm was measured in the plate reader (UVM 340 microplate reader, ASYS HITECH GMBH, Eugendorf, Austria).

Analysis of cell populations throughout the cell culture: Flow cytometry

The percentages of different cell populations present in the cultures were measured using fluorescein-activated cell sorter (FACS) analysis as previously described in Arranz *et al.*⁵⁰ After 1, 2, 3 or 5 days of culture, cells were recollected from the culture plates and labeled with phycoerythrin-conjugated CD4 (clon H129.19), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD8 (clon 53-6.7), FITC-conjugated CD19 (clon 1D3), FITC-conjugated CD11c (clon HL3), FITC-conjugated CD11b (clon M1/70.15) or FITC-conjugated CD25 (clon 7D4) antibodies, all purchased from BD Pharmingen, (Erembodegem, Belgium), except CD11b purchased from Caltag Laboratories (Chatujak Bangkok, Thailand). Incubation with antibodies was performed at 4 °C for 30 min in phosphate-buffered saline with 1% bovine serum albumin. Lymphocytes were distinguished by their different forward-scatter (FSC) versus side-scatter (SSC) profiles and were electronically gated and scored. Cells were incubated with single fluorochrome-conjugated antibodies or isotype-matched control antibodies, to compensate for fluorescence emission overlap and nonspecific fluorescence, respectively. Cells were fixed with phosphate-buffered saline containing 0.3% paraformaldehyde and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using an appropriate scatter gate to exclude dead cells, cellular debris and residual erythrocytes. Stained cell populations were analyzed using FCS Express v3 program.

Analysis of cytokine pattern expression in culture supernatants: ELISA assays

The levels of IL-6, TGFβ1, IL-12p70, IL-4 (all purchased from Bender MedSystems, Burlingame, CA, USA), IL-10, IFNγ, TNFα (all purchased from BD Bioscience, San Agustín de Guadalix, Madrid, Spain), IL-17, IL-23 (both purchased from eBioscience, San Diego, CA, USA), IL-22, IL-21 (both purchased from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and IL-9 (purchased from Ray Biotech, Norcross, GA, USA) were measured in culture supernatants on day 3 and 5 by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) test, according to the manufacturer's instructions.

Pattern of cytokine and transcription factor mRNA expression: RNA extraction and quantitative real-time PCR

For total RNA extraction we used TriReagent method (Sigma-Aldrich), following the manufacturer's recommendations. RNA was resuspended in diethylpyrocarbonate water, quantified with NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop products, Wilmington, NC, USA) and stored at -80 °C. Total RNA (2 μg) was reverse transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR analysis was carried out using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for all genes. β-Actin was used as the endogenous reference gene. Sequences of the primers used and accession numbers of the genes are previously described in Jimeno *et al.*,³⁰ except for the IL-9 and IL-4. The sequence of primers used was: IL-4 forward 5'-CGAGGTCACAGGA GAAGGGA-3', reverse 5'-AAGCCCTACAGACGAGCTCACT-3'; IL-9 forward 5'-CTTCAGTTCTGTGCTGGGCC-3', reverse 5'-TGCATTTTGACGGTGGA TCAT-3'.

Amplification was carried out in a 7900 HT Fast Real-Time PCR Systems apparatus (Applied Biosystems) under the following conditions: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing/extension at 60 °C for 1 min. For relative quantification, we used a method that compares the amount of target normalized to an endogenous reference. The formula used was $2^{-\Delta\Delta C_t}$ representing the n-fold differential expression of a specific gene in a treated sample compared with the control sample, where C_t is the mean of the threshold cycle (the cycle at which the amplification of the PCR product is initially detected). ΔC_t was the difference in the C_t values for the target gene and the reference gene, β-actin (in each sample assayed), and $\Delta\Delta C_t$ represents the difference between the C_t from stimulated on day 1 gene expression and each datum. Previously, we performed a validation experiment comparing the standard curve of the reference and the target, to demonstrate that efficiencies were approximately equal.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained in at least six mice. Comparison between groups was made using Student's *t*-test.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants PI080025 from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), GR58/08 from UCM-BSCH and by grants from the ISCIII to RJ and SPG. This work was partially supported by RETICS Program, RD08/0075 (RIER) from ISCIII, within the VI PN de I+D+I 2008-2011.

- 1 Betteli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature* 2008; **453**: 1051–1057.
- 2 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 1998; **97**: 145–173.
- 3 Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010; **11**: 674–680.
- 4 Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 490–500.
- 5 Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from TH17, TH1 and TH2 cells. *Nat Immunol* 2009; **10**: 864–871.
- 6 Veldhoen M, Uytendhoeve C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J *et al*. Transforming growth factor- 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 2009; **9**: 1341–1346.
- 7 Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010; **130**: 166–171.
- 8 Zhu J, Paul WE. CD4T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; **112**: 1557–1569.
- 9 O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity helper CD4⁺ T cells. *Science* 2010; **327**: 1098–1102.
- 10 Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010; **20**: 4–12.
- 11 Wei L, Vahedi G, Sun HW, Watford WT, Takatori H, Ramos HL *et al*. Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation. *Immunity* 2010; **32**: 840–851.
- 12 Dickson L, Finlayson K. VPAC and PAC receptors: from ligands to function. *Pharmacol Ther* 2009; **121**: 294–316.
- 13 Gomariz RP, Martínez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2001; **7**: 89–111.
- 14 Gomariz RP, Juarroz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martínez C. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann NY Acad Sci* 2006; **1070**: 51–74.
- 15 Gonzalez-Rey E, Anderson P, Delgado M. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**: iii70–iii76.
- 16 Laburthe M, Couvineau A, Tan YV. Class II G protein coupled-receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007; **28**: 1631–1639.
- 17 Langer I, Robberecht P. Molecular mechanisms involved in vasoactive intestinal peptide receptor activation and regulation: current knowledge, similarities to and differences from the A family of G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 724–738.
- 18 Smalley SG, Barrow PA, Foster N. Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 2009; **157**: 225–234.
- 19 Arranz A, Abad A, Juarroz Y, Leceta J, Martínez C, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 2008; **15**: 46–53.
- 20 Calafat M, Larocca L, Roca V, Hauk V, Pregi N, Nesse A *et al*. Vasoactive intestinal peptide inhibits TNF-alpha-induced apoptotic events in acinar cells from nonobese diabetic mice submandibular glands. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**: R53.
- 21 Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001; **7**: 563–568.
- 22 Lodde BM, Mineshiba F, Wang J, Cotrim AP, Afione S, Tak PP *et al*. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**: 195–200.
- 23 Deng S, Xi Y, Wang H, Hao J, Niu X, Li W *et al*. Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. *Cell Immunol* 2010; **265**: 105–110.
- 24 Gutiérrez-Cañás I, Juarroz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL *et al*. Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 2008; **22**: 312–317.
- 25 Leceta J, Gomariz RP, Martínez C, Carrión M, Arranz A, Juarroz Y. Vasoactive intestinal peptide (VIP) regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2007; **14**: 134–138.
- 26 Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L. Vasoactive intestinal peptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol* 2006; **26**: 430–437.
- 27 Pozo D, Anderson P, González-Rey E. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 2009; **183**: 4346–4359.

- 28 Roca V, Calafat M, Larocca L, Ramhorst R, Farina M, Franchi AM *et al*. Potential immunomodulatory role of VIP in the implantation sites of prediabetic nonobese diabetic mice. *Reproduction* 2009; **138**: 733–742.
- 29 Yadav M, Rosenbaum J, Goetzl EJ. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J Immunol* 2008; **180**: 2772–2776.
- 30 Jimeno R, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Martínez C, Juarranz Y, Leceta J. New insights into the role of VIP on the ratio of T cell subsets during development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 2010; **88**: 734–745.
- 31 Juarranz Y, Abad C, Martínez C, Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Rossignoli F *et al*. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**: R1034–R1045.
- 32 Korn T, Betelli E, Oukka M, Kuchroo K. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 485–517.
- 33 Abad C, Martínez C, Juarranz Y, Arranz A, Leceta J, Delgado M *et al*. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; **124**: 961–971.
- 34 Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4T cell populations. *Ann Rev Immunol* 2010; **28**: 445–489.
- 35 Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B *et al*. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 2009; doi 10.1172/JCI37865.
- 36 Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 216–224.
- 37 Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA *et al*. IL-4 inhibits TGF-induced Foxp3⁺ T cells and together with TGFβ₁ generated IL-9⁺ IL10⁺ Foxp3⁺ effector cells. *Nat Immunol* 2008; **9**: 1347–1355.
- 38 Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signalling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010; **33**: 153–165.
- 39 Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A *et al*. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; **30**: 899–911.
- 40 Yoshimura A, Wakabashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGFβ. *J Biochem* 2010; **147**: 781–792.
- 41 Zeng WP, Chang C, Lai JJ. Immune suppressive activity and lack of T helper differentiation are differentially regulated in natural regulatory T cells. *J Immunol* 2009; **183**: 3583–3590.
- 42 Boudard F, Bastide M. Inhibition of mouse T-cell proliferation by CGRP and VIP: effects of these neuropeptides on IL-2 production and cAMP synthesis. *J Neurosci Res* 1991; **29**: 29–41.
- 43 Teresi S, Boudard F, Bastide M. Effect of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide on murine CD4 and CD8T cell proliferation. *Immunol Lett* 1996; **50**: 105–113.
- 44 Abad C, Juarranz Y, Martínez C, Arranz A, Rossignoli F, García-Gómez M *et al*. cDNA array analysis of cytokines, chemokines and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP. *Inflamm Bowel Dis* 2005; **11**: 674–684.
- 45 Delgado M, Muñoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFNγ synthesis by T cells. *J Neuroimmunol* 1999; **96**: 167–181.
- 46 Lu J, Zheng MH, Yan J, Chen YP, Pan JP. Effects of vasoactive intestinal peptide on phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2008; **8**: 1449–1454.
- 47 Dorsam ST, Vomhof-Dekrey E, Hermann RJ, Haring JS, Van der Steen T, Wilkerson E *et al*. Identification of the early VIP-regulated transcriptome and its associated interactome in resting and activated murine CD4T cells. *Mol Immunol* 2010; **47**: 1181–1194.
- 48 Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009; **30**: 616–625.
- 49 Delgado M, Martínez C, Johnson MC, Gomariz RP, Ganea D. Differential expression of vasoactive intestinal receptor 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1996; **87**: 5152–5161.
- 50 Lara-Marquez ML, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Shah MH, Karacay B. Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cell. *J Immunol* 2001; **166**: 2522–2530.

The Supplementary Information that accompanies this paper is available on the Immunology and Cell Biology website (<http://www.nature.com/icb>)

Artículo 2

The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP.

Rebeca Jimeno, Rosa P. Gomariz, Marina Garín, Irene Gutiérrez-Cañas, Isidoro González-Álvaro, Mar Carrión, María Galindo, Javier Leceta, Yasmina Juarranz.

Journal of Molecular Medicine
(*En revision*)

The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP.

Rebeca Jimeno • Rosa P. Gomariz • Marina Garín • Irene Gutiérrez-Cañas • Isidoro González-Álvaro • Mar Carrión • María Galindo • Javier Leceta • Yasmina Juarranz

Abstract

Our aim is to study the behaviour of memory Th cells (Th17, Th17/1 and Th1 profiles) from early RA (eRA) patients after their in vitro activation/expansion to provide information about its contribution to RA chronicity. Moreover we analyzed the potential involvement of VIP as an endogenous healing mediator. CD4⁺CD45RO⁺ T cells from PBMCs of HD and eRA were activated/expanded in vitro in the presence/absence of VIP. FACS, ELISA, RT-PCR and immunocytochemistry analyses were performed. An increase in CCR6⁺/RORC⁺ cells and in RORC-proliferating cells and a decrease in T-bet-proliferating cells and T-bet⁺/RORC⁺ cells were shown in eRA. mRNA expression of IL-17, IL-2, RORC, RORA, STAT3 and Tbx21

and protein secretion of IL-17, IFN γ and GM-CSF were higher in eRA. VIP decreased the mRNA expression of IL-22, IL-2, STAT3, Tbx21, IL-12R β 2, IL-23R and IL-21R in HD and it decreased IL-21, IL-2 and STAT3 in eRA. VIP decreased IL-22 and GM-CSF secretion and increased IL-9 secretion in HD and it decreased IL-21 secretion in eRA. VPAC2/VPAC1 ratio expression was increased in eRA. All in all, memory Th cells from eRA patients show a greater proportion of Th17 cells with a pathogenic Th17 and Th17/1 profile compared to HD. VIP is able to modulate the pathogenic profile, mostly in HD. Our results are promising for therapy in the early stages of RA because they suggest that targeting molecules involved in the pathogenic Th17, Th17/1 and Th1 phenotypes and targeting VIP receptors could have a therapeutic effect modulating these subsets.

Key message

- Th17 cells are more important than Th1 in the contribution to pathogenesis in eRA patients.
- Pathogenic Th17 and Th17/1 profile are abundant in activated/expanded memory Th cells from eRA patients.
- VIP decreases the pathogenic Th17, Th1 and Th17/1 profiles, mainly in healthy donors.
- The expression of VIP receptors is reduced in eRA patients respect to healthy donors, whereas the ratio of VPAC2/VPAC1 expression is higher.

Introduction

Immune memory facilitates the maintenance of health by preventing repeated infections but, if it becomes deregulated, it can also lead to chronic inflammation. Rheumatoid arthritis (RA) has been characterized by a Th1 response [1]. However this description has been modified with the discovery of a new Th subset, Th17, which play a key role in inflammatory and autoimmune diseases, including RA [1]. Pro-inflammatory cytokine IL-17 is the signature cytokine of Th17 cells, but can also be secreted

R. Jimeno · R. P. Gomariz · I. Gutiérrez-Cañas · M. Carrión · J. Leceta · Y. Juarranz (✉)

Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

e-mail: yashina@bio.ucm.es

M. Garín

División de Terapias Innovadoras en el S. Hematopoyético, CIEMAT/CIBERER, Madrid, Spain.

I. González-Álvaro

Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Princesa, Madrid, Spain.

M. Galindo

Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12), Madrid, Spain.

by non-immune cells [2]. Studies exploring the neutralization of IL-17 by antibodies or using IL-17-deficient mice showed that this cytokine is involved in the autoimmune collagen-induced arthritis (CIA) model [3]. In humans, existing studies suggest that Th17 cells and their related cytokines play an important role in the pathogenesis of RA and its number in peripheral blood is associated with disease activity [4]. Moreover, IL-17 levels are increased in the synovial fluid of RA patients [5]. This cytokine, through its specific receptors, is able to modulate the function of other cells in the joint such as fibroblast-like synoviocytes (FLS), macrophages, chondrocytes and osteoclasts [3,5,6,]. Thereby, IL-17 is a key orchestrator of RA chronicity. In addition to IL-17, other molecules have been tested as markers of the occurrence of Th17 cells in RA, such as the transcription factor RORC, the major lineage-specifying transcription factors for Th17 subset development [7], and the chemokine receptor CCR6, the characteristic Th17 homing receptor [8]. It has been described that in both peripheral blood of healthy donors (HD) and synovial fluid of RA patients, all IL-17-producing T cells expressing RORC were CCR6+ [9]. In addition, other transcription factors are strongly associated with the Th17 subset, such as RORA or STAT3 [1,7].

Recent evidence suggests that Th17 cells may exhibit a pathogenic or non-pathogenic phenotype according to their cytokine secretion profile [10,11]. Pathogenic Th17 cells secrete IL-17, IL-21, IL-22, IL-2, IFN γ and GM-CSF and non-pathogenic Th17 cells secrete IL-17, IL-21, IL-9 and IL-10. This heterogeneity of Th17 cells is barely known in human RA. Moreover, epigenetic studies have shown that the Th17 subset is a less committed lineage when compared to Th1 and Th2 cells [1]. Th17 cells are reported to exhibit a high degree of phenotypic instability and plasticity, which enable them to acquire a Th1-like phenotype [12]. In RA patients, a strong association between Th17 and Th1 subsets has been shown, being also described the presence of a Th17/1 intermediate subset [13,14], which belongs to the pathogenic Th17 phenotype.

As Th17 and Th1 are important in the pathogenesis of RA, the study of the effect of microenvironment mediators could be important to the design of therapies for their modulation. Vasoactive intestinal peptide (VIP), one of the best-studied immunomodulatory neuropeptides [15,16], is secreted by lymphocytes and FLS in the joint [17]. VIP is involved in a broad range of functions through its binding to its specific receptors, VPAC1 and VPAC2 [18]. Healing effects of VIP in animal models of inflammatory/autoimmune diseases, including a

decrease of Th1 and Th17 profiles, have been reported [15,16,19,21,]. In vitro studies have shown that VIP induces Th17 differentiation [20,22,23]. Specifically, it has been described that VIP prevents arthritis in a CIA model through its anti-inflammatory and immunomodulatory actions [19]. There are also evidences for VIP therapeutic effects in human RA [16,17].

To date, studies on the involvement of Th17 and Th1 cells in RA pathology have analyzed their presence in blood or in synovial fluid of patients. However, little is known about the behavior of memory Th cells after their in vitro activation/expansion in early RA (eRA) that may provide information about the involvement of these cells in RA chronicity. Our aim is to examine, for the first time, in HD and in eRA patients the resulting phenotype after seven days of in vitro activation/expansion of memory Th cells, analyzing both the Th17/1 and Th1 profiles and the specific profile and pathogenicity of Th17 cells. Moreover, we examine the role of VIP in the modulation of Th1, Th17/1 and Th17 phenotypes, studying the involvement of its receptors.

Methods

Patients

Samples from thirteen HD and fourteen eRA patients were included in this study. The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committees of the Transfusion Center of Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) and La Princesa and 12 de Octubre hospitals (Madrid). Only data from patients fulfilling the 2010 ACR/EULAR criteria for eRA were collected [24]. Blood samples were collected previous to treatment prescription. HD were recruited from the Transfusion Center. Following the Spanish Personal Data Protection law, their demographic information was confidential. Among eRA patients, there were two males and twelve females, 71.4% tested positive for ACPA, the mean age was 56.4 ± 4.2 years (mean \pm SD) and the mean DAS28 was 4.1 ± 0.6 (mean \pm SD).

Isolation of human peripheral blood memory T cells

Memory Th cells were isolated from whole blood from HD and eRA patients. For mononuclear cell isolation, density gradient centrifugation by Ficoll–Hypaque (Sigma Aldrich) was used. CD4+ T cells were isolated by negative selection using a CD4+ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec).

CD4+CD45RO+ T cells were then isolated by negative selection using CD45RA+ MicroBeads (Miltenyi Biotec). The purity of CD4+CD45RO+ T cells was greater than 92%. In vitro expansion of human memory T cells CD4+CD45RO+ T cells were cultured at 10×10^4 and at 5×10^4 cells/well (for HD and eRA patients, respectively) in RPMI-1640-GlutaMAX media (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Lonza) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Cells were activated/expanded with anti-CD3/anti-CD28 coated beads (Life Technologies). CD4+CD45RO+ T cells were cultured in the absence or presence of 10nM of VIP (Polypeptide group) for both HD and eRA patients.

RNA Extraction and Semi-quantitative real-time PCR

For total RNA extraction we used the TriReagent method (Sigma Aldrich). 2µg RNA were reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Semi-quantitative RT-PCR analysis for all molecules tested was performed using TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), with the exception of IL-22, which was tested using SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies) [24]. β -actin was used as an endogenous reference gene. We normalized each sample with β -actin, using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Amplification was performed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System apparatus (Applied Biosystems).

Determination of secreted cytokines by ELISA

Cells were restimulated on day 7 with 20ng/ml Phorbol Myristate Acetate (PMA) and 0.5µM ionomycin (Sigma Aldrich) for 6 hours. The levels of IL-17A, IL-21, IL-22, IFN γ , IL-9 (eBioscience) and IL-10 (Diaclone) in supernatants were analyzed by ELISA. Final values were corrected considering the final volume of the cultures and the number of viable cells in each sample.

Flow cytometry analysis

After seven days of culture, cells were collected and labelled with Phycoerythrin-conjugated CCR6 (clone 11A9, BD Pharmingen). Cells were then fixed and permeabilized with Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmingen) according to the manufacturer's specifications. Next, cells were labelled with Alexa Fluor 488 conjugated T-bet (Clone O4 46, BD Pharmingen), Allophycocyanin-

conjugated RORC (clone AFKJS-9, eBioscience) and Brilliant Violet 711-conjugated Ki67 (clone Ki-67, BioLegend). Auto-fluorescence and isotype controls were set up to define non-specific fluorescence. Cytometric analysis was performed using a LSR Fortesa flow cytometer (Becton Dickinson, using BD FACSDiva software). Data analysis was performed using FCS Express v3 (De Novo Software).

Immunocytochemistry staining

On day 7, cell suspensions were centrifuged onto glass slides, dried and fixed. After rehydration and blocking, cells were incubated with 0.02mg/mL rabbit anti-VPAC1 polyclonal antibody and mouse anti-VPAC2 monoclonal antibody (Acris Antibodies). Cells were then incubated with 1µg/mL Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG antibodies (Life Technologies) and counterstained with 1µg/ml Hoechst. Fluorescence was examined on an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model (Olympus) and a Leica SP-2 AOBS confocal microscope with inverted stand Leica DM IRE2 (Leica).

Statistical Analysis

Samples were tested with a Normality test. A t-test was used to compare different groups and correlations were conducted using Pearson's coefficient test. Both statistical tests were done using GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software).

Results

Th17 and Th1 phenotypes in eRA patients versus HD.

We analyzed the presence of Th17 (T-bet-/RORC+), Th1 (T-bet+/RORC-) and Th17/1 (T-bet+/RORC+) cells by flow cytometry after seven days of in vitro activation/expansion of Th cells from eRA patients and HD (Fig. 1). Results showed that RORC+ cells were more abundant than T-bet+ cells in both HD and eRA patients (Fig. 1B). Percentage of total RORC+ cells was higher, although not significantly, in eRA patients than in HD, whereas the percentage of total T-bet+ cells was lower (Fig. 1C). Percentage of T-bet+/RORC+ cells was significantly lower in eRA patients (Fig. 1D).

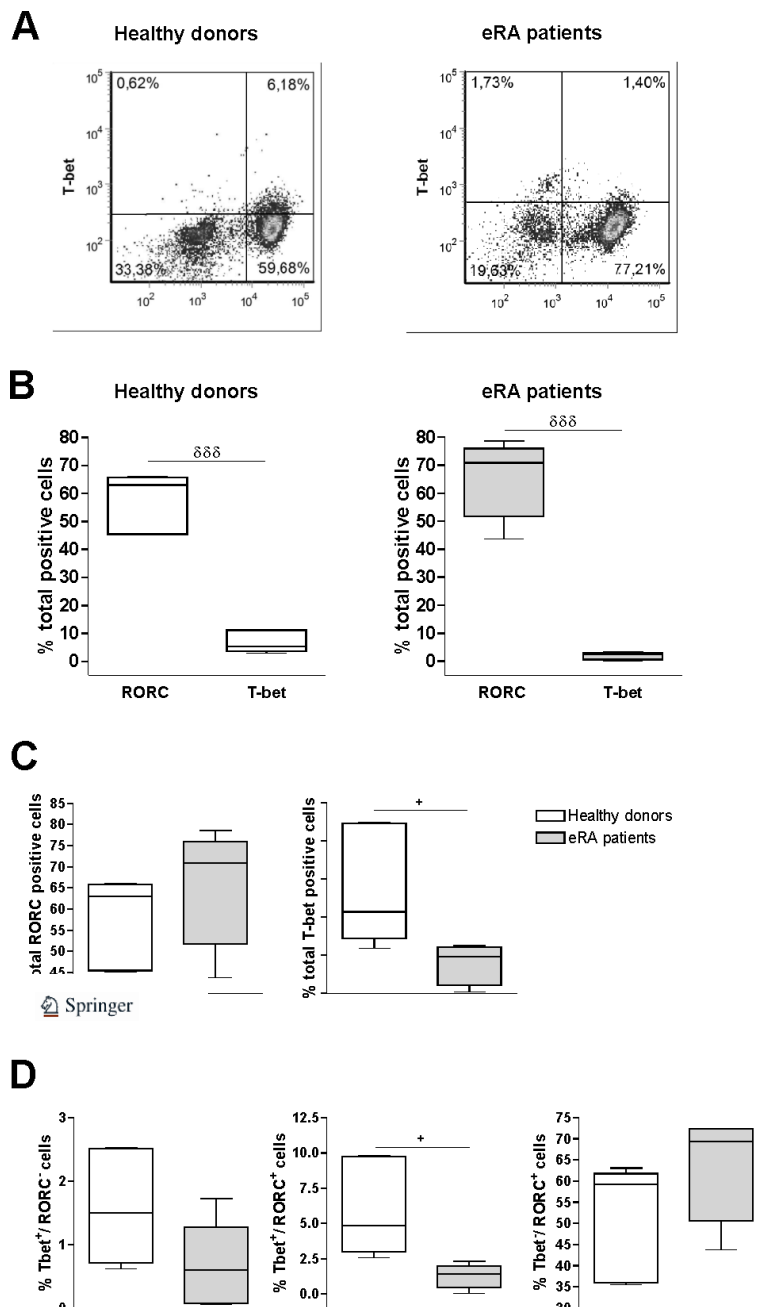
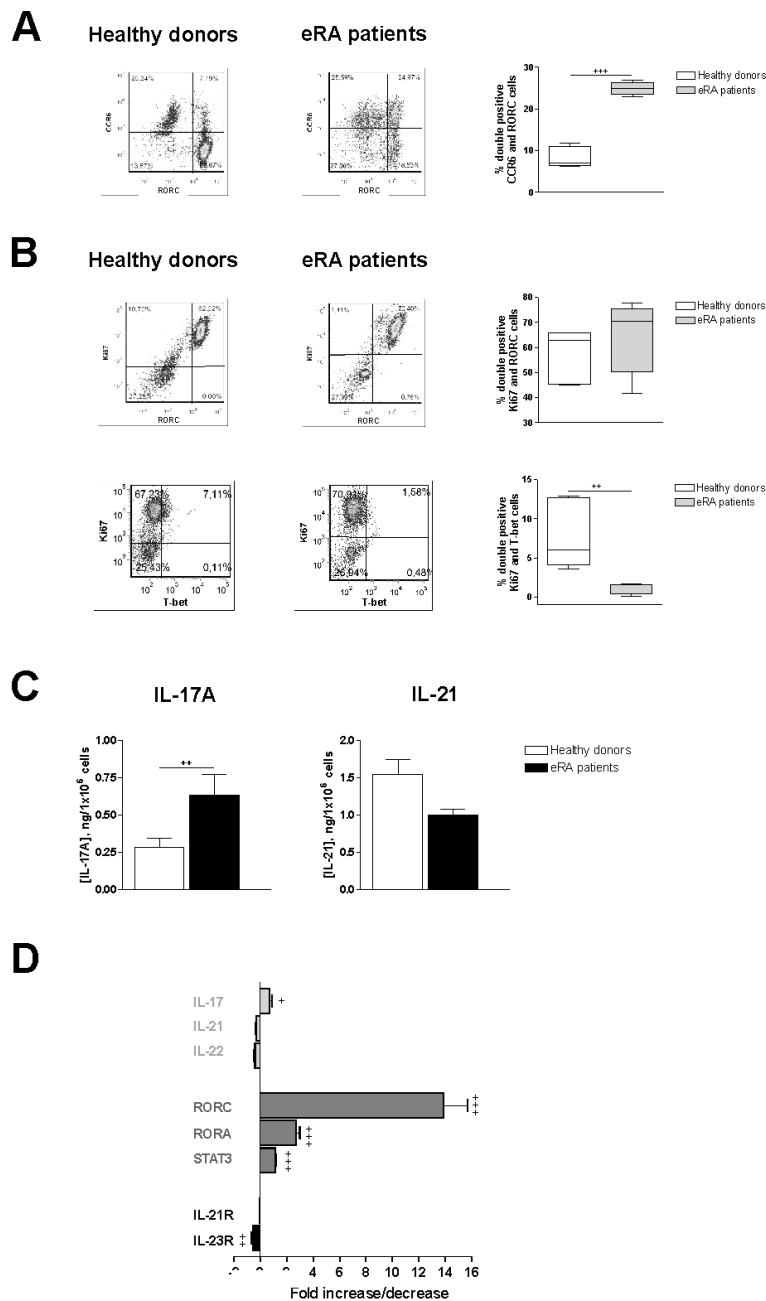


Fig.1. Th17 and Th1 phenotypes of activated/expanded memory Th cells from eRA patients and healthy donors. T-bet and RORC expression was determined by flow cytometry analysis in memory Th cells after activation/expansion for seven days. Auto-fluorescence and isotype controls were set up to determine the non-specific fluorescence signal. A, Figure shows a representative dot plot analysis indicating T-bet/RORC expression. B-C, Figure shows the percentage of total RORC positive cells, total T-bet positive cells. D, Figure shows the percentage of Tbet⁺/RORC⁻ cells, Tbet⁺/RORC⁺ and Tbet⁺/RORC⁺ cells. Data are the mean \pm SEM of three different cultures, performed in triplicate. Differences between RORC and Tbet expression in CD4⁺CD45RO⁺ T cells were statistically significant, $\delta\delta\delta P < 0.001$. Differences between CD4⁺CD45RO⁺ T cells from HD and eRA patients were statistically significant, $+P < 0.05$.

Pathogenic Th17 phenotype in eRA patients versus HD.

Given the high frequency of Th17 cells in both HD and eRA patients we studied deeply their Th17 population. First, we characterized the Th17 subset through the expression of RORC and CCR6. Flow cytometric analysis of CCR6 and RORC double expressing cells showed a significant increase in eRA (Fig.2A). Then, we determined the cell proliferation by analysis of Ki67-expression by flow cytometry in RORC-expressing cells. As shown in Fig. 2B, eRA patients have a slight increase of Ki67⁺RORC⁺ cells compared to HD. However, the percentage of Ki67⁺Tbet⁺ cells were significantly

decreased in eRA patients. Next, we checked the secretion of IL-17 and IL-21 in culture supernatants. Memory Th cells from eRA patients showed significantly higher levels of IL-17 (Fig. 2C). In addition, we characterized by RT-PCR the expression of cytokines, transcription factors and cytokine receptors of the Th17 profile. IL-17A, RORC, RORA and STAT3 expression were higher in eRA patients, whereas IL-23R was lower than in HD (Fig. 2D). Taken together, these results indicate that activated/expanded memory Th cells from eRA patients are more committed towards the Th17 subset.

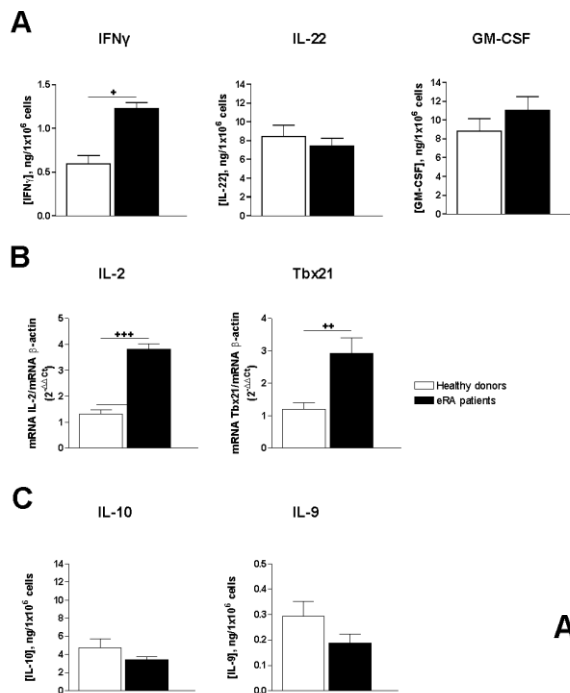


Next, we studied the pathogenic or non-pathogenic Th17 phenotype and the Th17/1 and Th1 profiles in eRA patients and HD. Cells from eRA patients secreted higher levels of IFN γ than HD (Fig. 3A). In addition, mRNA expression of IL-2 and Tbx21 (gene encoding T-bet protein, the lineage-specifying transcription factor for Th1) was higher in eRA patients (Fig. 3B). On the other hand, the levels of cytokines associated with a non-pathogenic phenotype IL-10 and IL-9 were slightly decreased in eRA patients, although not significantly (Fig. 3C). Together, these data indicate that activated/expanded memory Th cells from eRA patients show a more pathogenic Th17 and Th1 profile than memory Th cells from HD.

Fig. 2. Th17 profile of activated/expanded memory Th cells from eRA patients and healthy donors. A, CCR6 and RORC expression was determined by flow cytometry analysis in memory Th cells after activation/expansion for seven days. Auto-fluorescence and isotype controls were set up to determine the non-specific fluorescence signal. The figure shows a representative dot plot analysis indicating CCR6/RORC expression. The percentage of CCR6/RORC double positive cells was quantified. Data are the mean \pm SEM of three different cultures, performed in triplicate. B, Ki67/RORC and Ki67/T-bet expression were determined by flow cytometry analysis in memory Th cells after activation/expansion for seven days. Auto-fluorescence and isotype controls were set up to determine the non-specific fluorescence signal. The figure shows two representative dot plot analysis indicating Ki67/RORC and Ki67/T-bet expression. Percentage of Ki67/RORC and Ki67/T-bet double positive cells was quantified. Data are the mean \pm SEM of three different cultures, performed in triplicate. C, Protein expression of IL-17A and IL-21 was analyzed in culture supernatants by ELISA on day 7 of culture. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures, performed in duplicate. D mRNA expression of cytokines (light grey), transcription factors (dark grey) and cytokine receptors (black) was determined by real-time PCR in activated/expanded memory Th cells on day 7 of culture, after PMA and ionomycin stimulation. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4⁺CD45RO⁺ T cells from HD. The fold change of each mRNA expression with respect to different conditions is represented. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures performed in triplicate. Differences between CD4⁺CD45RO⁺ T cells from HD and eRA patients were statistically significant, +P<0.05, ++P<0.01, +++P<0.001.

VIP modulation of pathogenic Th phenotype in eRA patients versus HD.

The presence of VIP during in vitro activation/expansion of memory Th cells reduces the gene expression of not only cytokines, but also transcription factors and cytokine receptors related to the Th17 subset and the pathogenic Th17/1 and Th1 phenotypes, with a greater intensity in HD than in eRA patients (Fig. 4). First, we performed correlation



studies between the mRNA expression of master regulators of both Th17 and Th1 subsets. Results showed that, in memory Th cells from HD, RORC was positively correlated with Tbx21, while no correlation was observed in the presence of VIP (Fig. 4A). mRNA expression analysis showed that VIP significantly decreased IL-22, IL-2, STAT3, Tbx21, IL-12R β 2 (main IL-12 receptor subunit involved in Th1 differentiation), IL-23R and IL-21R in HD. However, VIP reduced IL-21, IL-2 and STAT3 expression in eRA patients (Fig. 4B). Next, we examined the effect of VIP on the secretion of several cytokines. The presence of VIP decreased IL-22 and GM-CSF levels in HD and IL-21 levels in eRA patients, whereas IL-9 was increased in HD (Table 1). Together, these data indicate that the presence of VIP during expansion/activation of memory Th cells induces a shift towards a non-pathogenic Th17 profile and decreases the Th1 and Th17/1 phenotypes, mainly in HD.

Expression of VIP receptors in memory Th cells in eRA patients and HD.

Although VPAC1 and VPAC2 receptors showed significantly lower mRNA expression, the VPAC2/VPAC1 ratio was higher in eRA patients (Fig. 5A). Additionally, we analyzed VPAC1 and VPAC2 protein expression in both HD and eRA patients by immunocytochemical analysis. As shown in Fig. 5B, both single stained (VPAC1 or VPAC2) and double positive cells were found in HD and eRA patients.

Fig. 3. Pathogenic Th17 and Th1 phenotypes of activated/expanded memory Th cells from eRA patients and healthy donors. **A**, Protein expression of IFN- γ , IL-22 and GM-CSF was analyzed in culture supernatants by ELISA after seven days of expansion/activation of memory Th cells and after PMA and ionomycin stimulation. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures, performed in duplicate. **B**, IL-2 and Tbx21 mRNA expression was determined by RT-PCR on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4+CD45RO+ T cells from healthy donors. **C**, Protein expression of IL-10 and IL-9 was analyzed in culture supernatants by ELISA after seven days of expansion/activation of memory Th cells and after PMA and ionomycin stimulation. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures, performed in duplicate. Differences between CD4+CD45RO+ T cells from HD and eRA patients were statistically significant, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

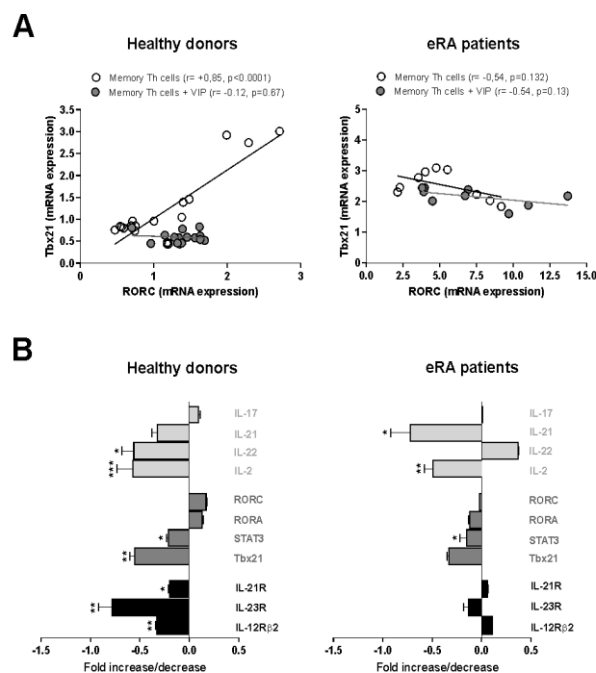


Fig. 4. VIP modulation of pathogenic Th17 and Th1 phenotypes of memory T cells from eRA patients and healthy donors. **A**, Correlation between mRNA expression of RORC and Tbx21 was determined using Pearson's coefficients tests. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures performed in triplicate. **B**, mRNA expression of cytokines (light grey), transcription factors (dark grey) and cytokine receptors (black) was determined by real-time PCR in activated/expanded CD4+CD45RO+ T cells on day 7 of culture, after PMA and ionomycin stimulation. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4+CD45RO+ T cells from HD. The fold change of each mRNA expression with respect to different conditions is represented. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures performed in triplicate. Differences between CD4+CD45RO+ T cells cultured in the presence and the absence of VIP were statistically significant, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

Table 1. Set of cytokines whose secretion is modified by VIP during activation/expansion of memory Th cells.

	Healthy donors		eRA patients	
	- VIP	+VIP	-VIP	+VIP
IL-21	1.54 ± 0.20	1.17 ± 0.09	0.99 ± 0.08	0.53 ± 0.08***
IL-22	8.42 ± 1.22	4.84 ± 0.97*	6.54 ± 0.93	6.25 ± 1.16
GM-CSF	11.83 ± 1.37	6.46 ± 0.80*	9.73 ± 1.51	7.57 ± 1.38
IL-9	0.29 ± 0.06	0.85 ± 0.27*	0.19 ± 0.03	0.28 ± 0.08

Values are ng of cytokines/1.106 cells. Data are the mean ± SEM of eight different cultures, performed in duplicate. Differences between CD4+CD45RO+ T cells cultured in the presence and the absence of VIP were statistically significant, *P<0.05, ***P<0.001.

Discussion

To date, different studies have described the contribution of Th1 and Th17 cells to RA chronicity by controlling numerous cellular events [1,3,4,25,26]. However, these studies have been mostly performed in non-activated cells from fresh blood of RA patients. The present study analyzed the pathogenic Th17 and Th17/1 profile of memory Th cells after in vitro activation/expansion during seven days in eRA patients and compared it to HD. Study in RA patients of recent onset allow to reproduce in vitro what might occur in patients with eRA in the active phase of the disease and avoid treatment interferences.

Th17 and Th1 involvement in RA is well established, however it is less defined whether RA is mostly mediated by Th17 or Th1 cells or whether each subset is important in a different phase of the disease. Likewise, the presence of Th17 cells co-expressing IFN γ has been described in RA [13,14]. Conversion of Th17 to Th1 phenotype might contribute to its pathogenic potential. Thus, in our studies we have characterized the presence of Th17, Th1 and Th17/1 cells within memory Th cells from eRA patients and compared it to HD after in vitro activation/expansion for seven days. Percentage of RORC+ cells was higher than T-bet+ cells in both HD and eRA patients, indicating that Th17 cells were more abundant than Th1 cells. We further characterize the Th17 profile and higher frequencies of double positive CCR6 and RORC cells were detected in eRA patients, in agreement with previous observations [9]. The CCR6 expression in Th17 cells suggests their ability to migrate to inflammatory sites [8] in response to an inflammatory microenvironment through the interaction with CCL20. Our proliferation studies on Th17 cells demonstrated that double positive Ki67 and RORC cells were slightly increased in eRA patients. However, the

percentage of double positive Ki67 and T-bet cells were significantly decreased in eRA patients, suggesting that Th17 cells are more responsive than Th1 cells, in agreement with previous observations [9,27]. This fact is further supported by the high expression of IL-17 in eRA patients. Moreover, mRNA expression of the transcription factors RORC, RORA and STAT3 are higher in eRA patients. These results also suggest the functional increase of the Th17 cells in eRA patients, although their frequency in eRA patients is not significantly increased. In this regard, although it has been described an increased frequency of Th17 cells in peripheral blood of RA patients [4,27], other studies have not confirm this increase [25]. Moreover, the hypothesis that the functional ability of Th17 cells is more important than their percentage in peripheral blood has been suggested [28]. Overall, we have found a stronger Th17 profile in activated/expanded memory Th cells from eRA patients than in HD, which agrees with the previously described important role of Th17 in RA [1,3,5]. IL-17 promotes the survival and proliferation of FLS in RA patients [6,29] and in turn, FLS are able to control the pathogenicity of Th17 by modulating IL-17R and IL-23 expression [6,29]. This feedback-loop mechanism could contribute to the synovium hyperplasia as well as to the inflammation in RA patients.

Recent reports indicate the existence of two types of functional Th17 cells depending on their cytokine secretion profile, pathogenic (IL-17, IL-21, IL-22, IL-2, IFN γ and GM-CSF) and non-pathogenic cells (IL-17, IL-21, IL-9 and IL-10) [10,11]. In addition, Th17 subset is also characterized by its phenotypic instability. Recent studies highlight the importance of their plasticity towards Th1 phenotype [12]. This phenomenon is even more relevant in RA patients given the implications of both subsets in the physiopathology of the disease [13,14] and it has been suggested as one cause for the

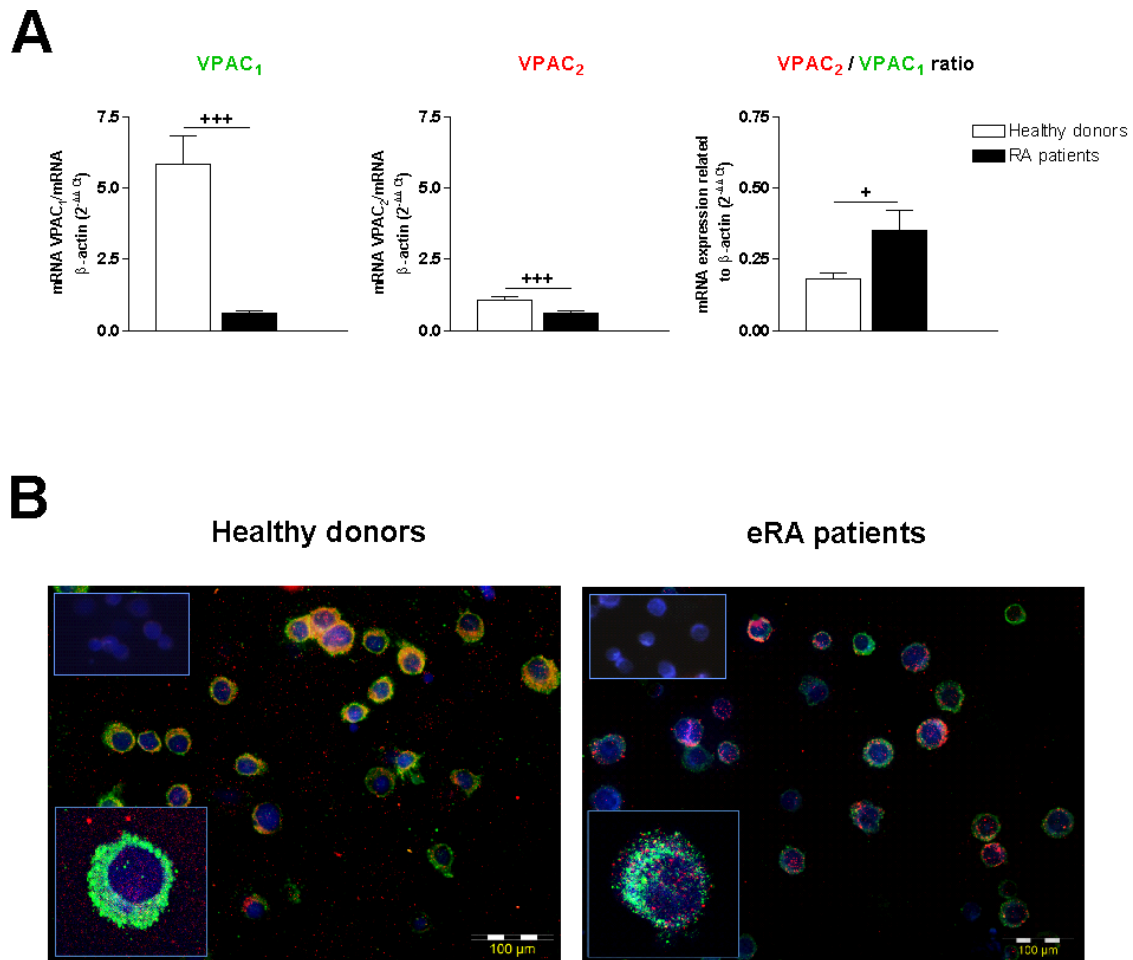


Figure 5. VIP receptor expression in memory Th cells from eRA patients and healthy donors. **A,** The individual mRNA expression and the ratio between mRNA expression of VPAC2 and VPAC1 was determined by RT-PCR in activated/expanded memory Th cells on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the VPAC2 mRNA expression of CD4+CD45RO+ T cells from healthy donors. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures performed in triplicate. Differences between CD4+CD45RO+ T cells from HD and eRA patients were statistically significant, $+P<0.05$, $+++P<0.001$. **B,** Protein expression of VPAC1 and VPAC2 receptors were analyzed by immunofluorescence staining. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue) and receptors were stained with Alexa Fluor 488 (green) and Alexa Fluor 594 (red) for VPAC1 and VPAC2, respectively. The figure shows a representative photo of activated/expanded memory Th cells from HD and eRA patients. Fluorescence was examined with an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model (objective 40X). Top left boxed areas show a representative area of a negative control, performed in the absence of anti-VPAC1 or anti-VPAC2 antibodies. Fluorescence was examined with an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model (objective 40X). Bottom left boxed areas show larger-magnification views of individual cells. Fluorescence was examined on a Leica SP-2 AOBS confocal microscope with inverted stand Leica DM IRE2 (objective 63X).

failure of therapies targeting Th17 cells [5]. Our results reported that the percentage of total T-bet positive cells was lower in eRA patients. Given that the percentage of T-bet+/RORC-cells was similar in both HD and eRA patients, this decrease in the T-bet percentage was due to the decrease in the percentage of T-bet+/RORC+ cells. It has been described that the frequency of IFN γ -producing CD4 T cells in peripheral blood from RA patients was lower compared to HD [28]. Likewise, it has also been shown no differences in the percentage of IFN γ +IL17-, IFN γ +IL17+ and IFN γ -IL17+ in the peripheral blood of RA patients compared to HD [25]. Other authors have shown lower levels of Th17/1 cells in peripheral blood suggesting

that it is due to the increase of their recruitment in the joint [13,14]. On the other hand, results show a strong pathogenic and related to Th1 profile phenotype in eRA patients, showing higher levels of IFN γ and GM-CSF cytokines and lower levels of IL-10 and IL-9 cytokines. High level of IL-2 and Tbx21 mRNA expression was also found in eRA patients. The discrepancy between the percentage of T-bet-expressing cells and the mRNA data related to T-bet expression could be due to a more T-bet transcription individually, although a lesser percentage of total T-bet positive cells. On the other hand, it also may be due to a post-transcriptional modulation of this molecule, for example by miRNAs or lcnRNAs. In any case,

the T-bet levels were enough to induce a greater IFN γ transcriptional response. In summary, our results indicate that activated/expanded memory Th cells from eRA patients show stronger pathogenic Th17 and Th17/1 profiles than cells from HD.

An endogenous mediator able to mediate the Th17 subset to a non-pathogenic phenotype and inhibit the Th17/1 and Th1 profiles would be a good candidate as a therapeutic agent in inflammatory diseases, specifically in RA. A recent study reported that patients who were unable to increase VIP levels in peripheral blood showed a worse clinical course despite receiving more intense treatment [30]. It is known that VIP modulates Th1, Th2, Th17 and Treg subsets [15,16,19,23]. However, little is known about VIP modulation and VPAC receptor expression in Th lymphocytes from RA patients. We studied, for the first time, the effect of VIP on the Th17 heterogeneity and plastic profile of activated/expanded memory Th cells from eRA patients.

Regarding the Th17/1 and Th1 profiles, VIP reduced the Th1 profile in HD, which agrees with previous *in vitro* data in mouse and human cells [19,20]. This neuroimmunopeptide was able to reduce the expression of two Th1 markers, Tbx21 and IL-12R β 2, and to induce a lack of correlation between RORC and Tbx21 in HD. In addition, VIP down-regulated the gene expression of several Th17 and Th1 markers and pathogenic indicators including IL-22, IL-2, STAT3, IL-23R and IL-21R in HD, but in eRA patients it only lowered IL-21, IL-2 and STAT3 expression. VIP also reduced IL-22 and GM-CSF production, as well as increased the IL-9 secretion, favouring the non-pathogenic profile in HD. IL-21 production was reduced in the presence of VIP in eRA patients. IL-21 has been implicated in RA [31] and blocking IL-21/IL-21R pathway showed an amelioration of the disease in RA animal models [32]. Moreover, IL-21 is a central memory T cell-associated cytokine that inhibits the generation of pathogenic Th1/17 effector cells [33]. NF κ B is an important transcription factor for IL-21 [34] and VIP is able to reduce it in several cells [19]. *Ex vivo* studies have previously demonstrated the modulatory effect of VIP in RA [15,16,17]. In a pro-inflammatory milieu, VIP induced the down-regulation of IL-22 specific receptors in FLS, diminishing their potential to respond to pathogenic Th17 cells [35]. Therefore, our results confirm the VIP-mediated decrease in Th17 and Th1 cytokines reported in several inflammatory/autoimmune disease models [19,20]. These VIP effects are mediated through its VPAC receptors. We demonstrated that VPAC1 and VPAC2 are

expressed in activated/expanded memory Th cells. In eRA patients, the expression of both receptors is reduced respect to HD, whereas the ratio of VPAC2/VPAC1 expression is higher. It has also been described that the presence and function of VPAC2 predominates over VPAC1 in FLS from RA patients [17]. This differential VIP receptor expression in eRA patients, and consequently different signal transduction, could also be involved in the weak effect of VIP in their cells. Although, other explanation of the smaller effect of VIP in eRA patients could be the differences in starting T cells, which are more pathogenic and associated to Th1 and Th17 phenotype.

Overall, our results indicate that activated/expanded memory Th cells from eRA patients generate a greater proportion of Th17 cells with a pathogenic Th17 and Th17/1 profile than those from HD. VIP lowered this pathogenic profile, being more important in HD. Findings presented here in RA patients with an early phase of the disease, are very interesting from a therapeutic point of view and support that targeting molecules involved in the generation of pathogenic Th17, Th17/1 and Th1 phenotypes could have beneficial effects. Likewise, targeting VIP receptors could have a therapeutic effect through the reduction of these pathogenic subsets.

Acknowledgements This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI11/00195, PI12/00758 and RETICS RD08/0075, RD12/0009/0002, RD12/0009/0017) within VI PNDE I+D+I by FEDER funds from EU and S2010/BMD-2350 from CAM and by grants from the ISCIII to RJ. The authors are grateful to the patients of the EA register from Hospital La Princesa and 12 de Octubre, and to the Transfusion Center of the CAM for recruiting healthy donors. The authors are also grateful to Carmen Moreno for her collaboration.

Conflict of interest A patent application (P201230827) for the use of VIP as a prognostic marker in autoimmune diseases has been deposited by the Fundación de Investigación Biomédica of La Princesa hospital at the Oficina Española de Patentes y Marcas. The full name of the patent application is: VIP use as a prognostic marker of autoimmune diseases.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

1. Dong W, Zhu P (2012) Functional niche of inflamed synovium for Th17-cell expansion and activation in rheumatoid arthritis: implication to clinical therapeutics. *Autoimmun Rev* 11:844–851.

2. Gu C, Wu L, Li X (2013) IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64:477-485.
3. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreff B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, van der Berg WB (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50:650-659.
4. Kim J, Kang S, Kim JK, Kwon G, Koo S (2013) Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Lab Med* 33:52-59.
5. Benedetti G, Miossec P (2014) Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 44:339-347.
6. Carrión M, Pérez-García S, Jimeno R, Juarranz Y, González-Álvarez I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I, Gomariz RP (2013) Inflammatory mediators alter IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblast. *Immunomodulation by VIP. Neuroimmunomodulation* 20:274-284.
7. Yang X O, Pappu B, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C (2008) TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28:29-39.
8. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.
9. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, Dolhain RJ, Lubberts E (2011) Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblasts interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum* 63:73-83.
10. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Hirahara K, O'Shea JJ (2011) T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol* 39:395-401.
11. Zúñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ (2013) Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* 252:78-88.
12. Lexberg MH, Taubner A, Albrecht I, Lepenies I, Richter A, Kamradt T, Radbruch A, Chang HD (2010) IFN γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur J Immunol* 40:3017-3027.
13. Arroyo-Villa I, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acín P, Nuño L, Bonilla-Hernán MG, Puig-Kröger A, Martín-Mola E, Miranda-Carús ME (2012) Frequency of Th17 CD4⁺ T cells in early rheumatoid arthritis: a marker of anti-CCP seropositivity. *PLoS One* 7:e42189.
14. Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M, Wedderburn LR (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14751-14756.
15. Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martínez C (2006) VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1070:51-74.
16. Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL, Leceta J (2008) Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 22:312-317.
17. Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP (2008) Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 58:1086-1095.
18. Harmar A J, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA, Said SI (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol* 166:4-17.
19. Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7:563-568.
20. Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Pérez-García S, Carrión M, Gomariz RP, Juarranz Y (2011) Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells. *Immunol Cell Biol* 90:178-186.
21. Leceta J, Gomariz RP, Martínez C, Carrión M, Arranz A, Juarranz Y (2007) Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 14:134-8.
22. Yadav M, Rosenbaum J, Goetzl EJ (2008) Cutting edge: Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J Immunol* 180:2772-2776.
23. Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Pérez-García S, Garín M, Mellado M, Gomariz RP, Juarranz Y (2014) Vasoactive Intestinal Peptide Maintains the Nonpathogenic Profile of Human Th17-Polarized Cells. *J Mol Neurosci* doi:10.1007/S12031-014-0318-3.
24. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62:2569-2581.
25. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y, Yoshikai Y (2008) Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:1299-1304.
26. Kato H, Endress J, Fox DA (2013) The roles of IFN- γ versus IL-17 in pathogenic effects of human Th17 cells on synovial fibroblasts. *Mod Rheumatol* 23:1140-1150.

27. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS (2009) Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60:1647-1656
28. Henriques A, Gomes V, Duarte C, Pedreiro S, Carvalheiro T, Areias M, Caseiro A, Gabriel AJ, Laranjeira P, Pais ML, da Silva JA, Paiva A (2013) Distribution and functional plasticity of peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 33:2093-2099.
29. Paulisse SMJ, van Hamburg JP, Davelaar N, Asmawidjaja PS, Hazes JMW, Lubberts E (2013) Synovial fibroblasts directly induce Th17 pathogenicity via the cyclooxygenase/prostaglandin E2 pathway, independent of IL-23. *J Immunol* 191:1364-1372.
30. Martínez C, Ortiz AM, Juarranz Y, Lamana A, Seoane IV, Leceta J, García-Vicuña R, Gomariz RP, González-Álvaro I (2014) Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One* 9:e85248.
31. Yuan FL, Hu W, Lu WG, Li X, Li JP, Xu RS, Li CW, Chen FH, Jin C (2011) Targeting interleukin-21 in rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep* 38:1717-1721.
32. Young D A, Hegen M, Ma HL, Whitters MJ, Albert LM, Lowe L, Senices M, Wu PW, Sibley B, Leathurby Y, Brown TP, Nickerson-Nutter C, Keith JC Jr, Collins M (2007) Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:1152-1163.
33. Kastirr I, Maglie S, Paroni M, et al (2014) IL-21 is a central memory T cell-associated cytokine that inhibits the generation of pathogenic Th1/17 effector cells. *J Immunol*. Doi:10.4049/jimmunol.1400775.
34. Chen G, Hardy K, Buting K, Stephen11 D, Ma L, Shannon F (2010) Regulation of the IL-21 gene by NFkB transcription factor c-Rel. *J Immunol* 185:2350-2359
35. Carrión M, Juarranz Y, Seoane IV, Martínez C, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I, Gomariz RP (2014) VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction. *J Mol Neurosci* 52:10-17.

Artículo 3

Vasoactive Intestinal Peptide Maintains the Nonpathogenic Profile of Human Th17-Polarized Cells.

Rebeca Jimeno, Javier Leceta, Carmen Martínez, Irene Gutiérrez-Cañas, Mar Carrión,
Selene Pérez-García, Marina Garín, Mario Mellado, Rosa P. Gomariz, Yasmina
Juarranz.

Journal of Molecular Neuroscience, 2014, May 8.
[Epub ahead of print].

Vasoactive Intestinal Peptide Maintains the Nonpathogenic Profile of Human Th17-Polarized Cells

Rebeca Jimeno · Javier Leceta · Carmen Martínez · Irene Gutiérrez-Cañas ·
Mar Carrión · Selene Pérez-García · Marina Garín · Mario Mellado ·
Rosa P. Gomariz · Yasmina Juarranz

Received: 20 January 2014 / Accepted: 28 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The cytokine microenvironment modulates CD4 T cell differentiation causing the shift of naïve CD4 T cells into different cell subsets. This process is also regulated by modulators such as vasoactive intestinal peptide (VIP), a neuropeptide with known immunomodulatory properties on CD4 T cells that exert this action through specific receptors, vasoactive intestinal peptide receptor (VPAC)₁ and VPAC₂. Our results show that the pattern of VIP receptors expression ratio is modified during Th17 differentiation. In this report, we evaluate the capacity of VIP to modulate naïve human cells into Th17 cells in vitro by analyzing their functional phenotype. The presence of VIP maintains the nonpathogenic profile of Th17-polarized cells, increases the proliferation rate, and decreases their Th1 potential. VIP induces the upregulation of the STAT3 gene interaction with the VPAC₁ receptor during the onset of Th17 differentiation. Moreover, RAR-related orphan receptor C (RORC), RAR-related orphan receptor A (RORA), and interleukin (IL)-17A genes are upregulated in the presence of VIP through interaction with VPAC₁

and VPAC₂ receptors. Interestingly, VIP induces the expression of the IL-23R gene through interaction with the VPAC₂ receptor during the expansion phase. This is the first report that describes the differentiation of naïve human T cells to Th17-polarized cells in the presence of VIP and demonstrates how this differentiation regulates the expression of the VIP receptors.

Keywords Th differentiation · Th17 · VIP · VPAC receptors

Introduction

The cytokine microenvironment and antigen-presenting cells drive in vivo differentiation and clonal expansion of naïve helper T cells, converting them to different effector cells with specific roles. Naïve human CD4 T cells can be committed to four major cells lineages, namely Th1, Th2, Th17, and induced regulatory T cells, on the basis of their cytokine and transcription factor (master regulator) signature (Zhu and Paul 2010). The cytokine signature profile of Th17 cells is formed by several cytokines such as interleukin (IL)-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22. Th17 cells are also characterized by the expression of chemokine receptors such as CCR6 and cytokine receptors such as IL-23R and IL-21R. Moreover, Th17 cells can secrete to a lesser extent interferon gamma (IFN- γ), IL-10, IL-9, IL-2, and other cytokines. The final effector functions of Th17 cells depend on the specific combination of the cytokines produced (Zhu and Paul 2008; Korn et al. 2009; Zhu and Paul 2010; Ghoreschi et al. 2011; Hirota et al. 2012). Increasing evidence points to a heterogeneous and inherent phenotypic instability in this subset (Ghoreschi et al. 2011; Hirota et al. 2012; Sundrud and Trivigno 2013). Th17 cells are susceptible to changing to Th1, most likely due to epigenetic

Rosa P. Gomariz and Yasmina Juarranz share senior authorship.

R. Jimeno · J. Leceta · I. Gutiérrez-Cañas · M. Carrión ·
S. Pérez-García · R. P. Gomariz · Y. Juarranz (✉)
Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
e-mail: yashina@bio.ucm.es

C. Martínez
Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina,
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

M. Garín
División de Hematopoyesis y Terapia Génica, Centro de
Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas,
Madrid, Spain

M. Mellado
Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de
Biotecnología, Madrid, Spain

regulation (Murphy and Stockinger 2010; O'Shea and Paul 2010; Zhu and Paul 2010; Hirota et al. 2012).

The inflammatory microenvironment causes Th17 cells a separate Th subset with a homeostatic role, able to clear pathogens that are less efficiently resolved by Th1 or Th2 (Chen and O'Shea 2008; Acosta-Rodriguez et al. 2007; Cua and Tato 2010). By contrast, Th17 cells have also been related to organ-specific autoimmune diseases (Korn et al. 2009; Hirota et al. 2012; Marwaha et al. 2012). In order to understand the potential role of Th17 cells in the development of massive inflammation and autoimmune diseases, it is important to know the regulatory mechanisms involved in their differentiation, proliferation, and function. Inhibitory cytokines, nuclear receptors, metabolic sensors, inhibitors of STATs, microRNAs (Hirahara et al. 2010; Bi and Yang 2012; Hirota et al. 2012) and probably immunomodulatory neuropeptides, are able to modulate Th17 cells.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a ubiquitous neuropeptide that plays important regulatory roles in many physiological processes through binding to its specific receptors, vasoactive intestinal peptide receptor (VPAC)₁ and VPAC₂ (Couvineau and Laburthe 2012; Harmar et al. 2012). In the immune system, VIP can modulate both innate and adaptive immunity, showing predominantly anti-inflammatory and immunomodulatory actions. In vivo mouse data indicate that VIP treatment may have a promising role in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases (Delgado et al. 2001; Gomariz et al. 2006; Lodde et al. 2006; Arranz et al. 2008; Calafat et al. 2009; Smalley et al. 2009; Gomariz et al. 2010). In several animal models of inflammation and autoimmune diseases, it has been described that VIP decreases cytokine expressions related to Th17 cells (Abad et al. 2005; Leceta et al. 2007; Jimeno et al. 2010). However, in vitro studies using mouse CD4⁺ T cells have reported that VIP plus transforming growth factor beta (TGF- β) promote their differentiation to a Th17 subset in a VPAC₁-dependent manner (Yadav et al. 2008). Thus far, the role of VIP in human Th17 cells remains unclear.

Th17 cells are considered a major link between innate and adaptive immune responses, having a critical role in normal host defense (Graeber and Olsen 2012). This important scenery demands a better understanding of how these cells work and how they may be modulated by the microenvironment in a normal host and within the framework of autoimmune disease. Given the multiple effects of VIP on immune microenvironments and its immunomodulatory role in human autoimmune diseases, it is important to better understand the influence of VIP during human Th17 cell differentiation. This is the first report that maps the cytokine and master regulator pattern of the Th17 subset after its differentiation from naïve human CD4 T cells under the influence of VIP, examining their functionality and describing how VPAC receptors are modulated during Th17 differentiation.

Materials and Methods

Isolation of Naïve Human T Cells

Naïve CD4⁺ T cells were isolated from the human cord blood from six healthy donors. The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki. The samples were obtained after the donors had signed a written informed consent and were approved by the ethics committee of the Transfusion Center (Comunidad de Madrid). For CD4⁺ T cells isolation, density gradient centrifugation by Ficoll–Hypaque (Sigma Aldrich) and negative selection using a commercial isolation system (RosetteSep[®] Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail from StemCell Technologies) were combined. Naïve T cells were then positively isolated with a MACS Cell Isolation kit using CD45RA⁺ MicroBeads (Miltenyi Biotec). The purity exceeded 90 %.

In Vitro Th17 Cell Polarization

Cells were cultured at 4×10^4 cells/well in RPMI 1640 GlutaMAX media (Life Technologies) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Lonza) and 1 % penicillin/streptomycin (Life Technologies). Cells were expanded with anti-CD3 and anti-CD28-coated beads (Life Technologies). Three types of cultures were established: Nonpolarizing conditions; Th17-polarizing conditions in the presence of human recombinant TGF- β (2 ng/ml; eBioscience), human recombinant IL-23 (10 ng/ml; eBioscience), human recombinant IL-6 (10 ng/ml; eBioscience), human recombinant IL-1 β (10 ng/ml; eBioscience), anti-IL-4 (2 μ g/ml; BD Pharmingen), and anti-IL-12p35 (2 μ g/ml; R&D System); and VIP/Th17-polarizing conditions as above plus 10 nM of VIP (Polypeptide Group). For VPAC receptor agonist and antagonist studies, 10 nM of agonist VPAC₁ [K¹⁵R¹⁶L²⁷VIP (1-7)/GRF (8-27)] or agonist VPAC₂ (RO 25-1553) were added instead of VIP; 1 μ M of VPAC₁ antagonist [AcHis¹DPh²K¹⁵R¹⁶L²⁷VIP (3-7)/GRF (8-27)] was added in addition to VIP. On day 4 of culture, medium was replaced with one containing the recombinant cytokines, peptides, and antibodies corresponding to each treatment but without anti-CD3 and anti-CD28 to avoid overstimulation.

RNA Extraction and Semiquantitative Real-Time PCR

For total RNA extraction, we used the TriReagent method (Sigma Aldrich). Total RNA (2 μ g) was reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Semiquantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis for all molecules tested was performed using TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), with the exception of IL-22, which was tested using SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life Technologies)

(Table 1). β -Actin was used as an endogenous reference gene. For each sample, we compared the amount of target mRNA normalized to the endogenous reference, using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Measurement of Cytokines

Cells were restimulated on day 7 with 20 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) and 0.5 μ M ionomycin (Sigma Aldrich) for 6 h. After stimulation, the levels of IL-17A, IL-21, IL-22, IFN- γ , IL-9, IL-2 (eBioscience), and IL-10 (Diacclone) were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Measurement of BrdU Incorporation

Cell proliferation was determined by incorporation of Bromodeoxyuridine (BrdU) into DNA using the Cell Proliferation Assay Kit (Roche). On days 4 and 7 of culture, cells were incubated with 10 μ M BrdU for 24 h. Absorbance at 450 nm with a 690-nm reference was measured in a plate reader (UVM 340 microplate reader, ASYS HITECH GMBH).

Measurement of Cell Viability

Viability of cells was determined by trypan blue dye exclusion assay. On day 7 of culture, cells were collected and incubated with trypan blue solution (1:1) and the number of viable and dead cells was counted. Cell viability was calculated as the relationship between the number of viable cells on day 7 and the total number of cells cultured.

Flow Cytometry Analysis

After 7 days of culture, cells were collected from the culture plates and labeled with phycoerythrin-conjugated CCR6 (clone 11A9, BD Pharmingen) at 4°C for 30 min. Cells were washed, fixed, and permeabilized with Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmingen) for 50 min at 4°C. Then, cells were labeled with Alexa Fluor 488-conjugated T-bet (O4-46, BD Pharmingen), allophycocyanin-conjugated RAR-related orphan receptor C (RORC; clone AFKJS-9, eBioscience) and Brilliant Violet 711-conjugated Ki67 (clone Ki-67, BioLegend) at 4°C for 1 h in perm/wash buffer. Auto-fluorescence and isotype controls were set up to define non-specific fluorescence.

Table 1 Genes analyzed by semiquantitative real-time polymerase chain reaction

Method	Gene	GenBank accession no.	Sequence position/assay location (TaqMan®)	Sequence/assay ID (TaqMan®)
SYBR® Green	β -Actin	E00829	1,435–1,535	Forward: 5'-AGAAGGATTCTATGTGGGCG-3' Reverse: 5'-CATGTCGTCCAGTTGGTGAC-3'
SYBR® Green	IL-22	NM_020525	256–368	Forward: 5'-ACAACACAGACGTTCTCTCATTG-3' Reverse: 5'-GAACAGCACTTCTCAAGGGTGA-3'
TaqMan®	IL-21R	NM_181079.3	275	Hs00222310_m1
TaqMan®	IL-23R	NM_144701.2	1,037	Hs00332759_m1
TaqMan®	IL-12R β 2	NM_001559.2	1,900	Hs00155486_m1
TaqMan®	RORC	NM_005060.3	182	Hs00172860_m1
TaqMan®	RORA	NM_002943.3	1,173	Hs00536545_m1
TaqMan®	AhR	NM_001621.4	1,318	Hs00169233_m1
TaqMan®	STAT3	NM_003150.3	488	Hs01047580_m1
TaqMan®	Foxp3	NM_014009.3	1,004	Hs01085834_m1
TaqMan®	Tbx21	NM_013351.1	707	Hs00203436_m1
TaqMan®	IL-17A	NM_002190.2	279	Hs00174383_m1
TaqMan®	IL-10	NM_000572.2	510	Hs00961622_m1
TaqMan®	IL-9	NM_000590.1	325	Hs00914237_m1
TaqMan®	IL-21	NM_021803.3	406	Hs00222327_m1
TaqMan®	IL-2	NM_000586.3	267	Hs00174114_m1
TaqMan®	IFN- γ	NM_000619.2	495	Hs00989291_m1
TaqMan®	VPAC ₁	NM_004624.3	306	Hs00270351_m1
TaqMan®	VPAC ₂	NM_003382.4	644	Hs00173643_m1
TaqMan®	β -Actin	NM_001101.3	54	Hs03023943_g1

Method, gene, genbank accession number, sequence position or assay location, and sequence or assay ID for each primer used in the study are shown

Immunocytochemistry Staining

On days 0 and 7, cell suspensions were centrifuged onto glass slides (50,000 cells/glass slide), dried, and fixed. Cells were then rehydrated and blocked with PBS containing 5 % goat serum and 5 % donkey serum. After washing, cells were incubated with 0.02 mg/ml rabbit anti-VPAC₁ polyclonal antibody and/or mouse anti-VPAC₂ monoclonal antibody (Acris Antibodies) for 1 h. After washing, cells were incubated for 45 min with 1 µg/ml Donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488-conjugated and goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 594-conjugated (Life Technologies). Cells were counterstained with 1 µg/ml Hoechst to visualize nuclear bodies.

Statistical Analysis

The *t* test was used to compare different cell populations, and correlations were conducted using Pearson's coefficient test. Both statistical tests were done using GraphPad Prism Version 4.0 software (GraphPad Software).

Results

In Vitro Differentiation of Th17 Cells and Its Maintenance by VIP

First, we analyzed the features of differentiated Th17 cells by checking protein expression of different cytokines in the supernatants after 7 days of culture (Fig. 1a). Signature cytokines of the Th17 subset such as IL-17A or IL-21 were significantly increased in the supernatants of Th17-polarized cells. Surprisingly, the Th17-polarized cells secreted significantly less IL-22 compared with nonpolarized cells. IFN- γ levels in supernatants of Th17-polarized cells were lower with respect to nonpolarized cells. Analysis of IL-2 and IL-10 production showed no clear differences between Th17-polarized and nonpolarized cells. Finally, IL-9 determination showed higher protein levels in Th17-polarized cells than in the nonpolarized cells. Thus, Th17-polarized cells in this in vitro system are characterized by high expression levels of IL-17A, IL-21, and IL-9 and low levels of IFN- γ and IL-22. Cytokine levels in VIP/Th17-polarized cells were similar to Th17-polarized cells, with the exception of IL-17A protein,

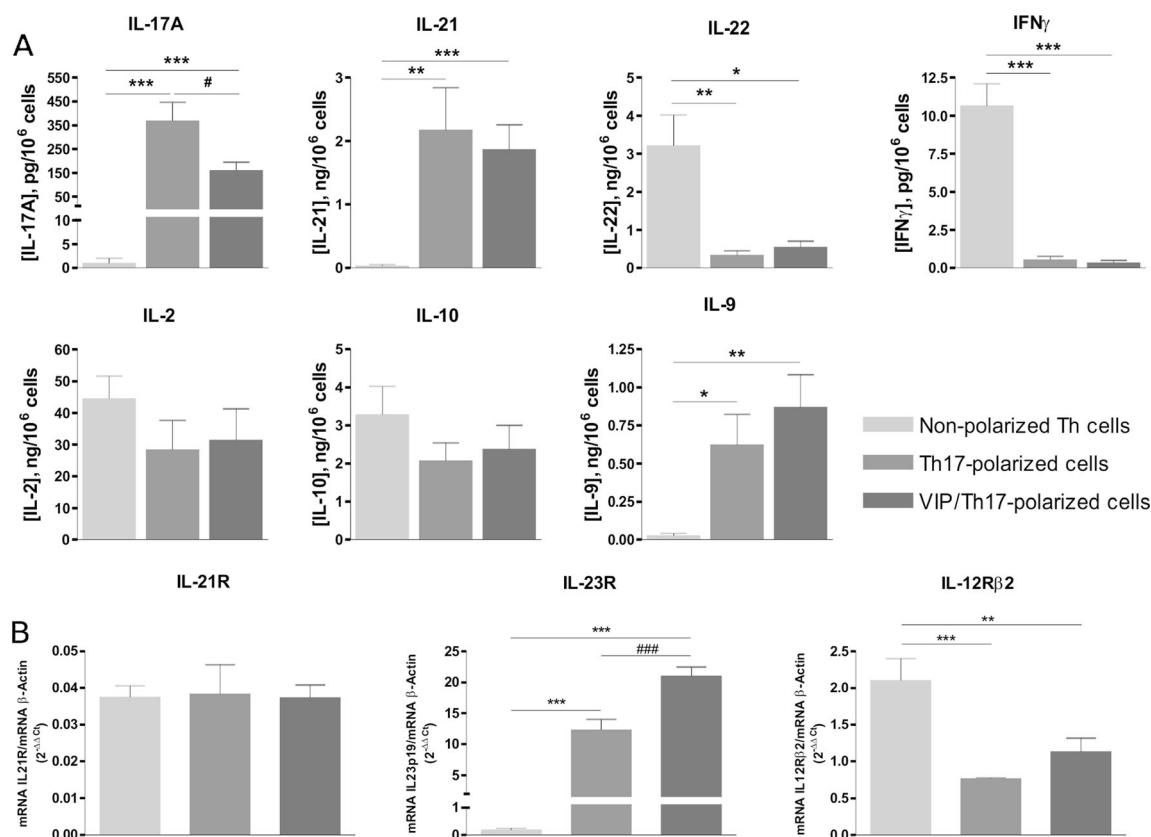


Fig. 1 Cytokine profile and cytokine receptor expressed by human Th17- and VIP/Th17-polarized cells. **a** Protein expression of IL-17A, IL-21, IL-22, IFN- γ , IL-2, IL-10, and IL-9 was analyzed in culture supernatants by ELISA. Values were corrected considering the final volume of supernatants and the number of viable cells of each sample. **b** mRNA expression of IL-21R, IL-23R, and IL-12R β 2 was determined

by real-time PCR on day 7. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4⁺CD45RA⁺ T cells (which was set at 1). Data are the mean \pm SEM of six different cultures, performed in duplicate or triplicate. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 nonpolarized cells versus the other conditions; #*P*<0.05; ###*P*<0.001 Th17-polarized versus VIP/Th17-polarized cells

which was lower in the Th17-polarized cells in the presence of VIP. Nevertheless, IL-17A levels were significantly higher in these cells than in nonpolarized cells.

We analyzed the mRNA expression of IL-21R, IL-23R, and IL-12R β 2 (Fig. 1b). Regarding IL-21R expression, similar levels of expression were determined in all cases. Our data also showed higher IL-23R mRNA levels in Th17-polarized cells compared with nonpolarized cells. VIP significantly increased the expression of IL-23R. IL-12 receptor expression was determined by the analysis of the IL-12R β 2 subunit. The results showed significantly decreased IL-12R β 2 expression in both Th17- and VIP/Th17-polarized cells.

We also examined the mRNA expression of transcription factors of different Th subsets (Fig. 2). Results showed that RORC, RAR-related orphan receptor A (RORA), and aryl hydrocarbon receptor (AhR) expression were higher in Th17-polarized than in nonpolarized cells. Analysis of STAT3 expression did not show significant differences between the two conditions. In contrast, Foxp3 and T-box transcription factor (Tbx21/T-bet) expression was lower in Th17-polarized than nonpolarized cells. Interestingly, VIP/Th17-polarized cells showed higher RORC, RORA, and STAT3 expression than Th17-polarized cells. In summary, the presence of VIP during human Th17 differentiation could maintain their Th17 commitment and significantly enhances IL-23R, RORC, RORA and STAT3 expression.

Functional Features of In Vitro Human Th17-Polarized Cells: Modulation by VIP

Recent studies have begun to shed light on the heterogeneity (pathogenic or nonpathogenic phenotype) and inherent phenotypic instability of Th17 subsets (McGeachy et al. 2007; Murphy and Stockinger 2010; Sundrud and Trivigno 2013). Different profiles of cytokines expressed by Th17 cells are related to the pathogenic or nonpathogenic phenotype of these cells, thus we determined the correlations between several cytokines, associated with proinflammatory or anti-inflammatory Th17 profiles, with IL-17 and RORC (Fig. 3). IL-17A levels were positively correlated with IL-10, IL-9, and IL-21 levels, either in the presence or absence of VIP, with a Pearson's coefficient (r) near 1.0 in all cases. Negative correlations were seen between IL-2 and IL-17A and between RORC and IL-22 (Pearson's coefficient close to -1) in both cases. Conversely, considering the balance of Th17/Th1, only when VIP is added to the cultures, IFN- γ and Tbx21 expressions were negatively correlated to the expression of IL-17A and RORC, respectively (Fig. 4a). Flow cytometric analysis of RORC- and T-bet-expressing cells on day 7 showed that 78.8 and 81.7 % of Th17- and VIP/Th17-polarized cells, respectively, were positive for RORC but negative for T-bet (Fig. 4b). A small percentage of RORC $^{+}$ /T-bet $^{+}$ double positive cells was detected, which

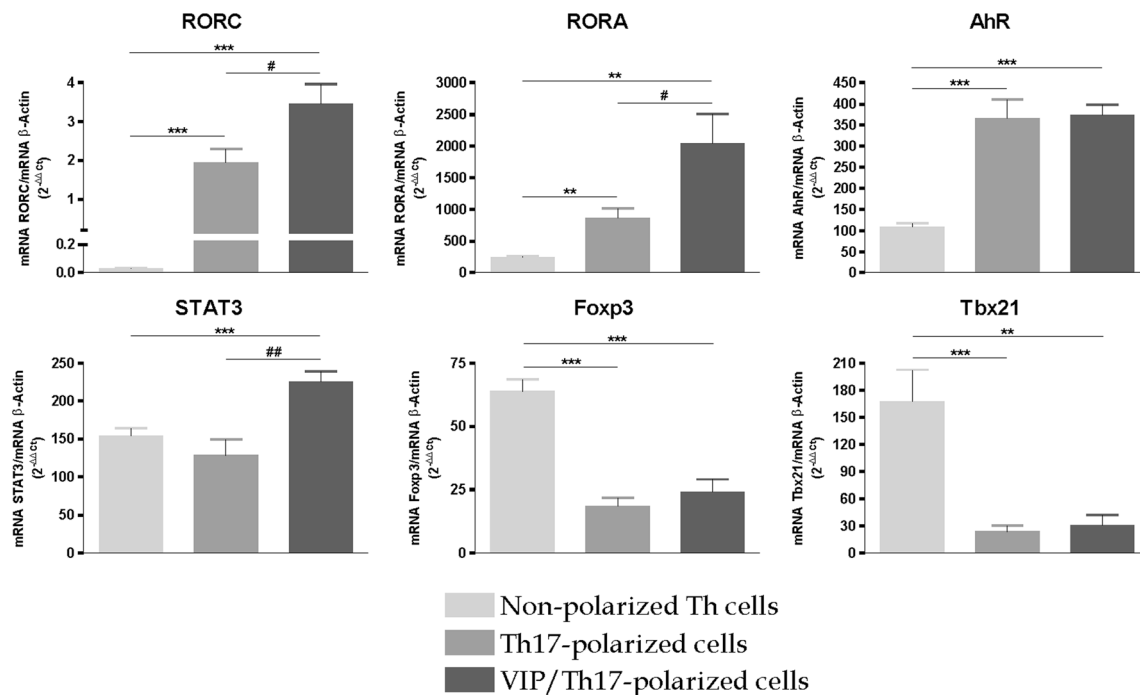
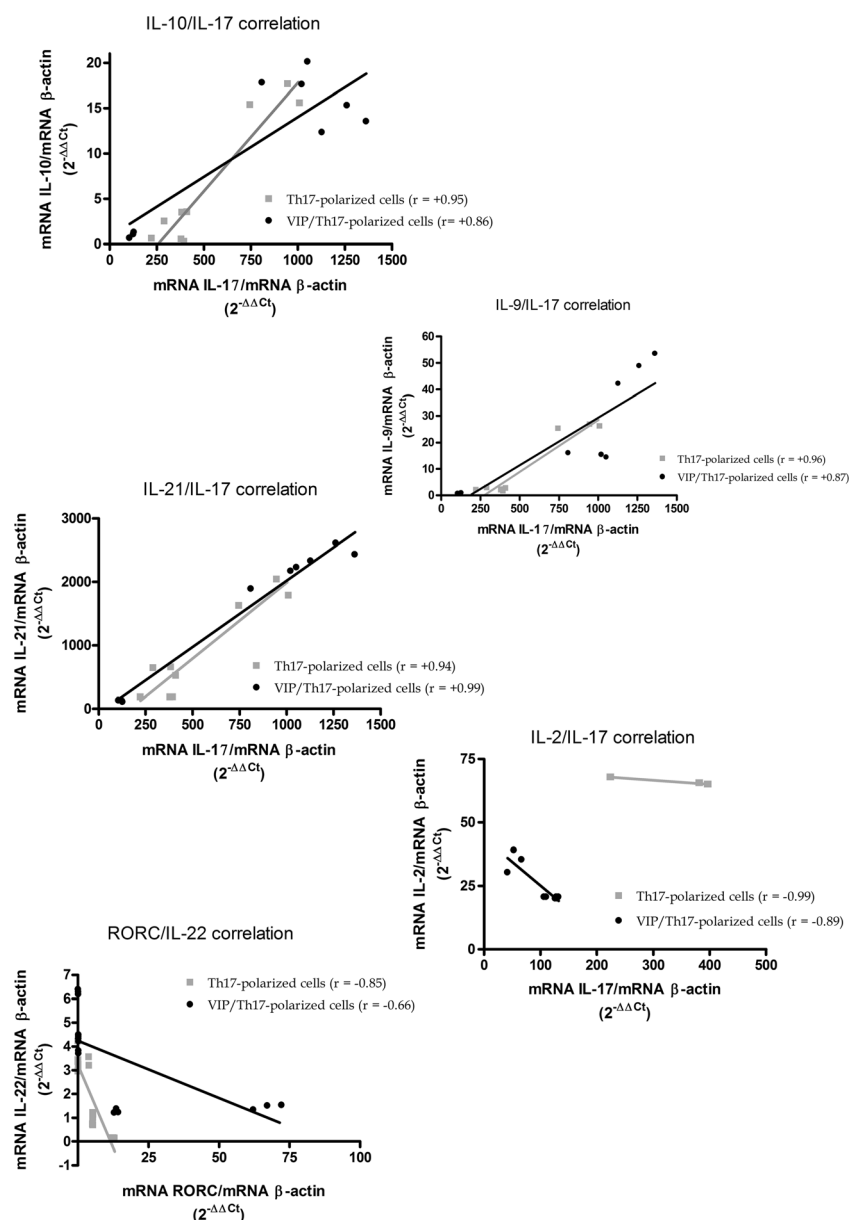


Fig. 2 Transcription factors expressed by human Th17- and VIP/Th17-polarized cells. mRNA expression of RORC, RORA, AhR, STAT3, Foxp3, and Tbx21 was determined by real-time PCR on day 7. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ T cells (which was

set at 1). Data are the mean \pm SEM of six different cultures, performed in duplicate or triplicate. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 nonpolarized cells versus the other conditions; # P <0.05; ### P <0.01; #### P <0.001 Th17-polarized versus VIP/Th17-polarized cells

Fig. 3 Relationships between mRNA expression of several cytokines and master regulators suggest a nonpathogenic Th17 phenotype. Correlation between mRNA expression of IL-10 and IL-17A, IL-9 and IL-17A, IL-21 and IL-17A, IL-2 and IL-17A, and RORC and IL-22 were determined by real-time PCR on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for 6 h. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4⁺CD45RA⁺ T cells (which was set at 1). Data are the mean \pm SEM of six different cultures performed in triplicate. Pearson's coefficients (r) are shown



was lower in VIP/Th17-polarized (1.87 %) than in Th17-polarized cells (3.85 %).

Functional features of Th cells depend on their proliferation and homing capacity. Hence, we also tested their proliferation rate by analyzing the incorporation of BrdU into DNA on days 4 and 7 (Fig. 5a). There were no significant differences between Th17- and VIP/Th17-polarized cells on day 4, whereas on day 7 Th17-polarized cells had higher levels of BrdU incorporation than nonpolarized cells. Interestingly, at day 7, the presence of VIP during the Th17 polarization of the naïve Th cells increased their proliferation rate compared with nonpolarized and Th17-polarized cells. In addition, we determined the cell viability of our cells on day 7. No differences were found in the cell viability between nonpolarized cells and

Th17-polarized cells and between Th17-polarized and VIP/Th17-polarized cells (Fig. 5a). In addition, we measured the proportion of cells that expressed RORC and the proliferation marker Antigen KI-67 (Ki67) by flow cytometric analysis (Fig. 5b). Around 83 % of total cells were double positive for RORC and Ki67. Almost all RORC cells were actively proliferating. No differences were observed when VIP was added to the cultures.

We explored the homing capacity of the Th17 cells by studying the expression of the chemokine receptor CCR6. Double positive RORC/CCR6 cells were detected on Th17-polarized (74.8 %) and in VIP/Th17-polarized cells (77.3 %) (Fig. 5c) indicating that Th17-polarized cells have a migration capacity and that VIP preserves their homing capacity.

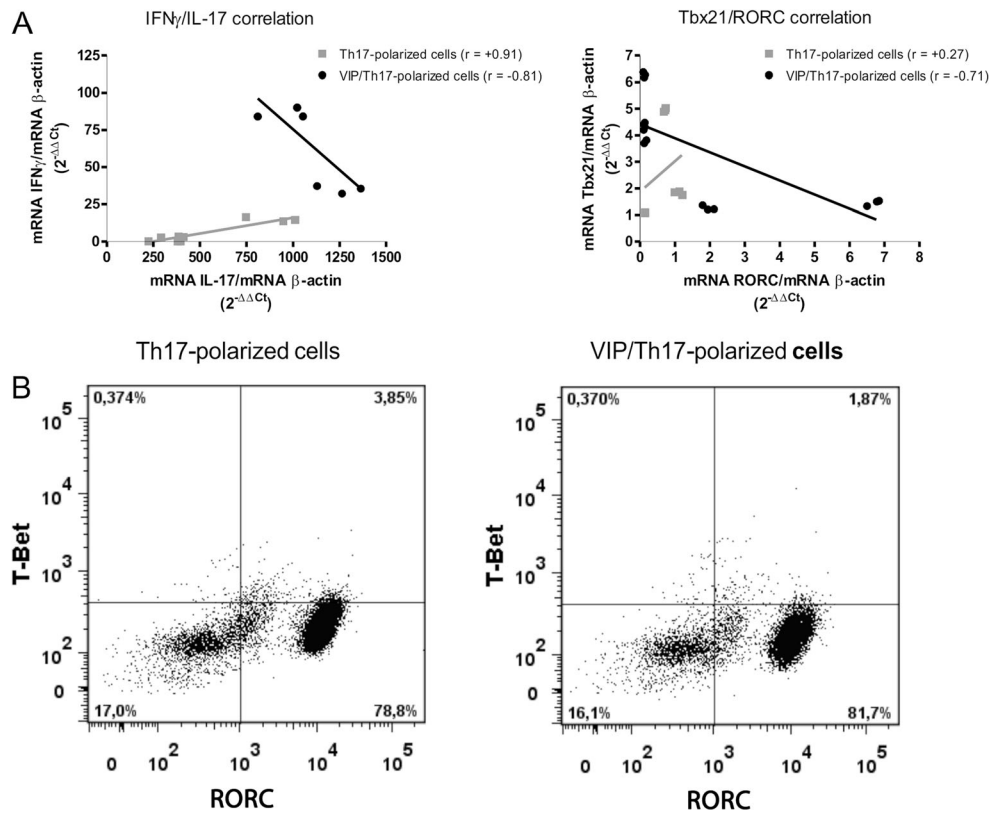


Fig. 4 Relationships between specific cytokines and master regulators for Th17 and Th1 subsets under VIP influence. **a** Correlation between mRNA expression of IFN- γ and IL-17A or Tbx21 and RORC was determined by real-time PCR on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for 6 h. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of CD4 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ T cells (which was set at 1). Data are the mean \pm SEM of

six different cultures performed in triplicate. Pearson's coefficients (r) are shown. **b** T-bet and RORC expression was determined by flow cytometry analysis. After 7 days of culture, cells were labeled with Alexa Fluor 488-conjugated T-bet and allophycocyanin-conjugated RORC. Figure shows a dot plot analysis indicating T-bet expression versus RORC expression in Th17-polarized and VIP/Th17-polarized cells. One representative experiment of three is shown

Switch in the Expression Pattern of VIP Receptors with Th17 Polarization

We tested the expression of VPAC $_1$ and VPAC $_2$ receptors for VIP. As Fig. 6a shows, VPAC $_1$ expression is downregulated during T cell culture under CD3 and CD28 stimulation whereas VPAC $_2$ expression is maintained with Th17 polarization. The ratio between mRNA expression of VPAC $_2$ and VPAC $_1$ receptors was significantly increased in activated/expanded cells with respect to CD4 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ T cells after 7 days of culture. This ratio was close to 1.0 in nonpolarized cells; however, it was significantly increased in Th17- and VIP/Th17-polarized cells. VIP/Th17-polarized cells increased the expression of both receptors but not significantly. The VPAC $_1$ increase in VIP/Th17-polarized cells was of greater magnitude compared with the VPAC $_2$ increase; consequently, the VPAC $_2$ /VPAC $_1$ ratio was significantly less than in Th17-polarized cells. VPAC receptor expression was corroborated at the protein level by immunocytochemical analysis (Fig. 6b). We detected

expression of both VPAC $_1$ and VPAC $_2$ in naïve Th cells and Th17-polarized cells. No staining was observed when isotype controls were used. These results confirmed the receptor pattern observed at the mRNA level. In summary, VPAC $_1$ could be the main receptor involved during the onset of Th17 generation, whereas Th17 differentiation induces a switch on VIP receptors, with VPAC $_2$ being the main receptor expressed after the differentiation of Th17 cells.

In order to test the specificity of VPAC receptor involvement in the effect of VIP during Th17-polarization, we used specific agonists and one antagonist (Fig. 7). The presence of VPAC $_1$ antagonist during the differentiation of VIP/Th17 cells significantly reduced IL-17A, STAT3, and RORC VIP-stimulated mRNA expression. RORA was also reduced but not significantly. In Th17-polarized cells, the VPAC $_1$ agonist significantly augmented IL-17A, RORC, RORA, and STAT3 mRNA expression compared with Th17-polarized cells. In Th17-polarized cells, the VPAC $_2$ agonist induced an increase in the expression of mRNA in all molecules tested with the exception of STAT3.

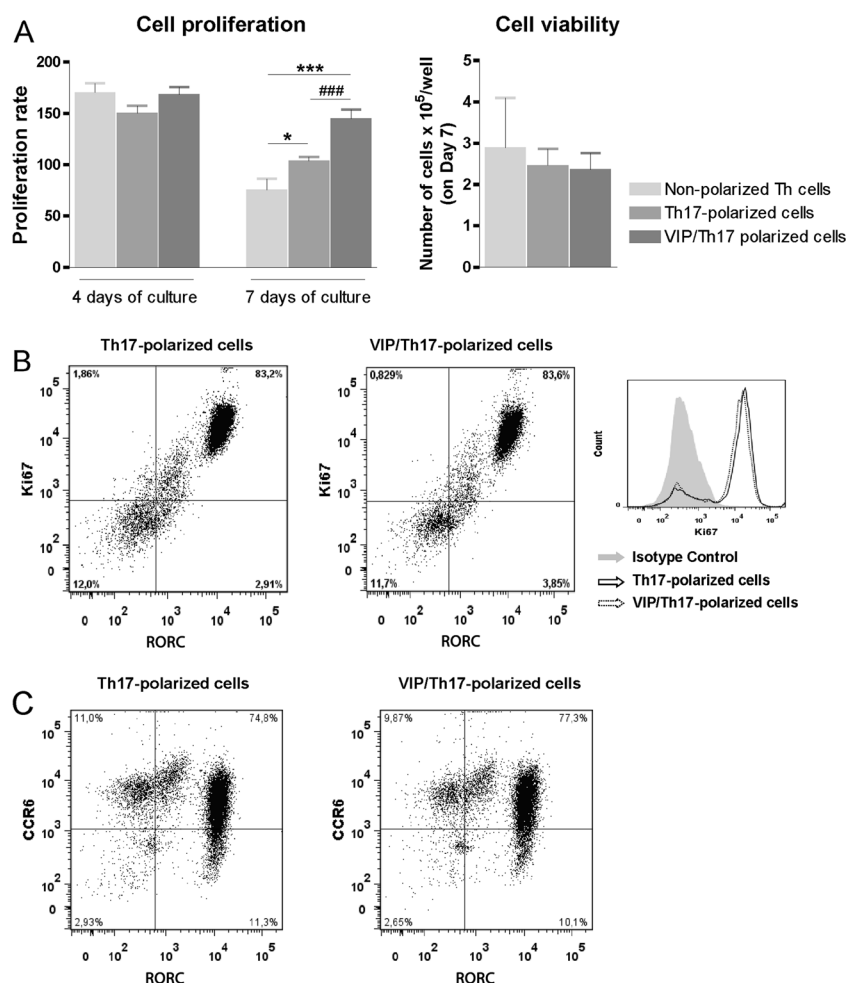


Fig. 5 Influence of VIP on proliferation and homing capacity of Th17-polarized cells. **a** Cell proliferation rate and cell viability were tested in the different cell populations. A colorimetric method based on BrdU incorporation into DNA during cell division was used in the cultures on days 4 and 7. According to the blank and background values, absorbance data were converted to percentages considering the mean of absorbance data of Th17-polarized cells of each sample as 100 %. Final results correspond to the mean \pm SEM of three different cultures. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ nonpolarized cells versus the other conditions; # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ Th17-polarized versus VIP/Th17-polarized cells. Viability of cells was determined by trypan blue dye exclusion assay on day 7 of culture in the different cell populations. Cell viability was calculated as the relationship between the number of viable cells on day 7 and the total number of cells

cultured. Values were adjusted considering the number of wells cultured for each sample. **b** Th17-polarized cells proliferation was also tested by flow cytometry analysis studying Ki67 and RORC expression. After 7 days of culture, cells were labeled with Brilliant Violet 711-conjugated Ki67 and allophycocyanin-conjugated RORC. Figure shows a dot plot analysis indicating Ki67 expression versus RORC expression and a histogram analysis indicating Ki67 expression. One representative example of three is shown. **c** Homing capacity of Th17-polarized cells was studied analyzing CCR6 expression by flow cytometry analysis. After 7 days of culture, cells were labeled with phycoerythrin-conjugated CCR6 and allophycocyanin-conjugated RORC. Figure shows a dot plot analysis indicating CCR6 expression versus RORC expression. One representative experiment of three is shown

Discussion

Th17 cells were initially described as the key pathogenic element in several autoimmune diseases (Korn et al. 2009; Hirota et al. 2012; Marwaha et al. 2012). Conversely, new evidence suggests that, depending on the microenvironment, Th17 cells can alter their differentiation program, inducing either protective/anti-inflammatory or proinflammatory responses (Ghoreschi et al. 2011; Marwaha et al. 2012; Sundrud and Trivigno 2013). How different factors of an inflammatory microenvironment can modulate differentiation, function or pathogenicity of human Th17 is still unclear and

requires further attention. Given the known immunomodulatory and anti-inflammatory role of VIP in several inflammatory and autoimmune disorders, we report for the first time the influence of this neuropeptide on human Th17 cell differentiation and function.

Many studies have examined Th17 differentiation in vitro, both in mouse and human. Although there are discrepancies between different authors about the importance of some cytokines, it is clear that IL-6, IL-1 β , and IL-21 are involved in human Th17 differentiation (Korn et al. 2009; Ganjalikhan et al. 2011; Hirota et al. 2012). The implication of TGF- β in this process is associated with the pathogenicity, or lack

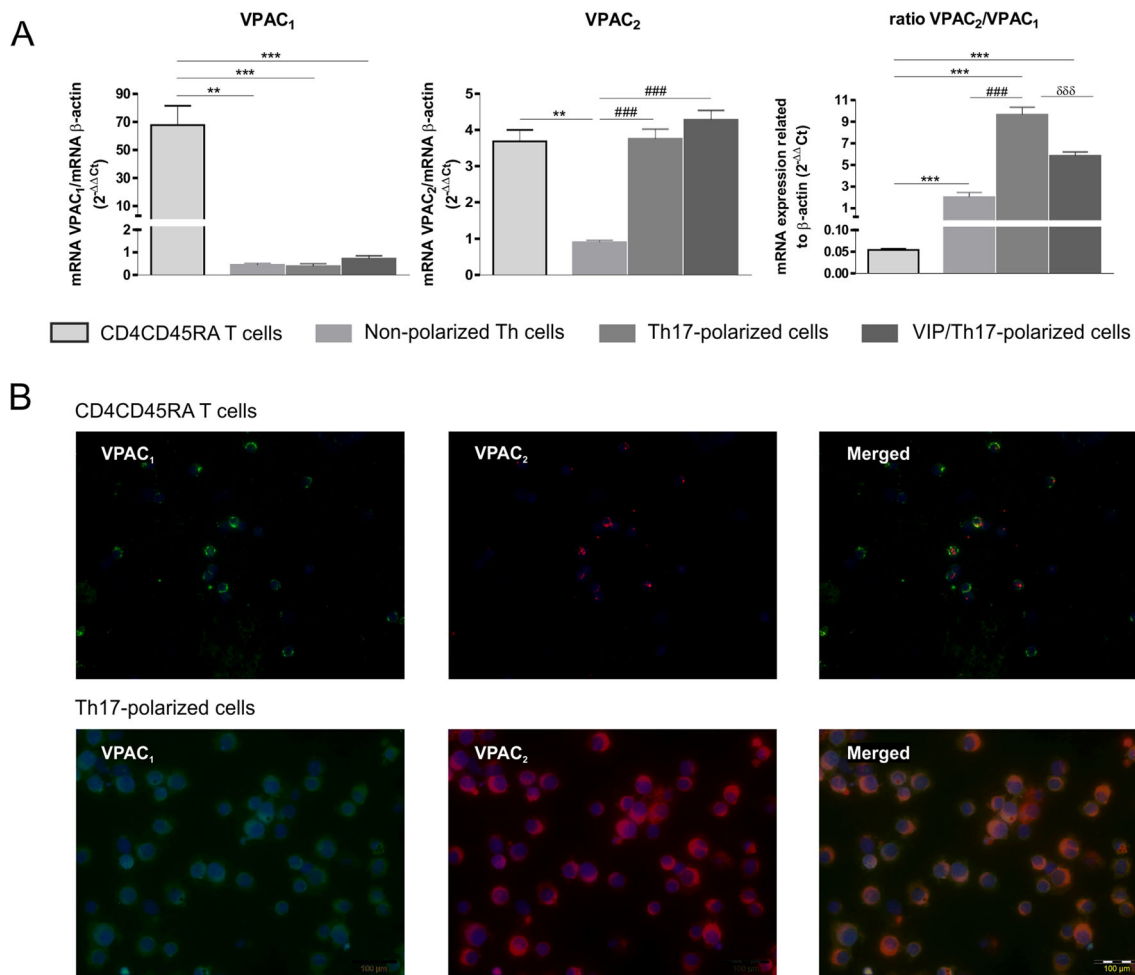


Fig. 6 Switch in the expression pattern of VPAC receptors during human Th17 differentiation. **a** mRNA expression of VPAC₁ and VPAC₂ was determined by real-time PCR on day 0 for CD4⁺CD45RA⁺ T cells and on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for 6 h for nonpolarized cells, Th17-polarized and VIP/Th17-polarized cells. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with VPAC₂ mRNA expression of nonpolarized cells (which was set at 1). Individual mRNA expression and the ratio between mRNA expression of VPAC₁ and VPAC₂ are shown. Data are the mean \pm SEM of five different cultures performed in triplicate. ** P <0.01; *** P <0.001

CD4⁺CD45RA⁺ T cells versus the other conditions; ### P <0.001 nonpolarized cells versus Th17-polarized cells; $\delta\delta\delta P$ <0.001 Th17-polarized versus VIP/Th17-polarized. **b** Protein expression of VPAC₁ and VPAC₂ receptors was analyzed by immunofluorescence staining in CD4⁺CD45RA⁺ T cells on day 0 and Th17-polarized cells on day 7. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue) and receptors were stained with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (green) and Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody (red) for VPAC₁ and VPAC₂, respectively. One representative example of three is shown

thereof, of Th17 cells. This cytokine is linked with the differentiation of a nonpathogenic phenotype (McGeachy et al. 2007; Ghoreschi et al. 2011; Zuñiga et al. 2013). Despite its implications in their potential pathogenicity (Lee et al. 2012), the presence of IL-23 is necessary for the stabilization of Th17 cells (Korn et al. 2009). In this sense, McGeachy et al. suggest that when cells are polarized in the presence of TGF- β , IL-6, and IL-23, the effect of the former are predominant with respect to IL-23 and this effect is related with a nonpathogenic phenotype (McGeachy et al. 2007). For these reasons, we used IL-6, IL1- β , IL-21, TGF- β , and IL-23 in our in vitro human Th17 differentiation model.

As expected, a main increase in IL-17A and IL-21 cytokines and the transcription factors RORC and RORA were

confirmed in Th17-polarized cells. Indeed, a positive correlation between IL-21 and IL-17A was observed. By contrast, a decrease in IL-22 levels was detected in Th17-polarized cells. A negative correlation between IL-22 and RORC was observed in Th17-polarized cells. In accordance with these findings, it has been described that T cells restimulated in the presence of TGF- β and IL-6 did not induce IL-22 expression (McGeachy et al. 2007). Related to IL-2 expression, results showed a slight tendency to decrease IL-2 secretion and a negative correlation between IL-2 and IL-17 in Th17-polarized cells. IL-2, a survival factor of Th cells, inhibits Th17 differentiation at early stages, but can expand Th17 cells at a late stage (Amadi-Obi et al. 2007; Korn et al. 2009). Their high expression levels in Th17 cells have been associated with

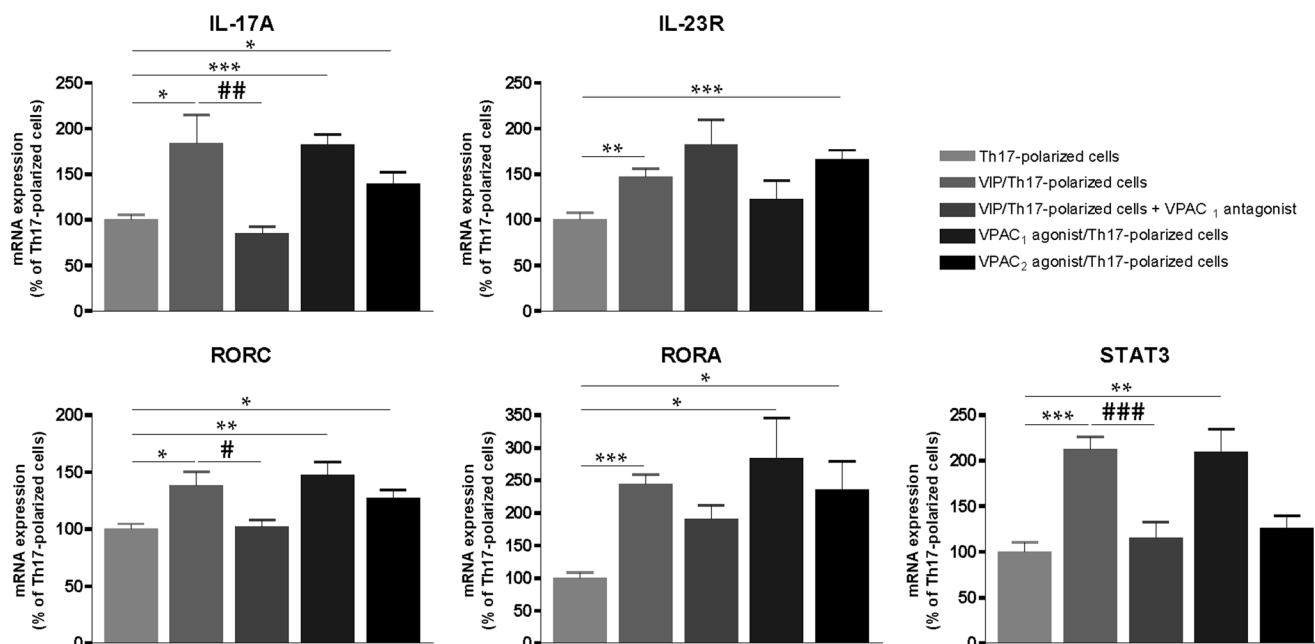


Fig. 7 Effect of specific agonists and antagonist for VPAC receptors during Th17 polarization. mRNA expression of IL-17A, IL-23R, RORC, RORA, and STAT3 was determined by real-time PCR on day 7 of culture. Different conditions for Th17-polarized cells were performed. Data were analyzed normalizing with β -actin mRNA expression and compared with mRNA expression of nonpolarized cells (which was set at 1). Data for

Th17-polarized cells was referred as 100 % and the other mRNA expression calculated as a percentage with respect to Th17-polarized cells. Data are the mean \pm SEM of three different cultures performed in triplicate. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001, Th17-polarized cells versus the other conditions; # P <0.05; ## P <0.01; ### P <0.001, VIP/Th17-polarized cells versus VIP/Th17-polarized cells+VPAC₁ antagonist cells

a pathogenic phenotype in these cells (Ghoreschi et al. 2011; Zuñiga et al. 2013). Meanwhile, similar levels of IL-10 were detected in nonpolarized and Th17-polarized cells. By contrast, the IL-9 levels were increased in Th17-polarized cells. A positive correlation between IL-10 and IL-17 and between IL-9 and IL-17 levels appears in Th17-polarized cells. The production of IL-10 and IL-9 by Th17 cells points to their potential nonpathogenic/anti-inflammatory phenotype (Ghoreschi et al. 2011; Zuñiga et al. 2013). In this sense, Th17 cells activated in the presence of TGF- β and IL-6 secrete IL-17 and IL-10, suggesting a potential regulatory function for these cells or a possible regulatory mechanism to counteract their pathogenic potential (McGeachy et al. 2007). In addition, it has been demonstrated that IL-9 nonsecreting Th17 cells were more pathogenic than IL-9 secreting Th17 cells (Beriou et al. 2010). With regard to the cytokine receptor, we observed higher IL-23R mRNA levels in Th17-polarized cells than in nonpolarized cells. Therefore, Th17-polarized cells are able to respond to IL-23, the cytokine necessary for the stabilization of this subset. Different reports relate IL-23R expression to the pathogenicity of Th17 cells (Lee et al. 2012; Zuñiga et al. 2013). However, this receptor is not exclusive of pathogenic Th17 cells, but the overexpression of IL-23R is related to a pathogenic/proinflammatory phenotype (Ghoreschi et al. 2011; Lee et al. 2012; Zuñiga et al. 2013). Aside from RORC and RORA, another transcription factor closely related to the Th17 subset is AhR. As has been

previously described, AhR expression was significantly increased in Th17-polarized cells (Veldhoen et al. 2008). Ghoreschi et al. showed that Th17 cells, differentiated in the presence of TGF- β , express high levels of AhR and demonstrated that these cells are less pathogenic than Th17 cells differentiated in the absence of TGF- β that do not express AhR (Ghoreschi et al. 2011). Taking into account all of these data, our data show that Th17 cells differentiated in our culture conditions present the following characteristics of a nonpathogenic/anti-inflammatory profile: an increase in IL-9 secretion, AhR expression, and a decrease in IL-22 and IFN- γ secretion and T-bet expression. In addition, we demonstrated positive correlations between IL-17 and cytokines related to nonpathogenic phenotype (IL-17 and IL-10, IL-17, and IL-9) and a negative correlation with pathogenic indicators (IL-17 and IL-2 and RORC and IL-22).

From the standpoint of plasticity and heterogeneity, Th17 cells are closely related to the Th1 subset (Murphy and Stockinger 2010; O'Shea and Paul 2010). The levels of IFN- γ and Tbx21 were decreased in Th17-polarized cells. It has been suggested that TGF- β downregulates Tbx21 expression and as a consequence IFN- γ expression (Ghoreschi et al. 2011; Zuñiga et al. 2013), decreasing IFN- γ ⁺/IL-17⁺ double-secreting Th17 cells (Ganjlikhani et al. 2011). A low percentage of RORC⁺/T-bet⁺ double-positive cells was observed in our cultures. Moreover, IL-12R β 2 expression was significantly decreased after Th17-differentiation, in agreement with

previous reports (Korn et al. 2009). On the basis of all of these findings, we document a decrease in Th1 profile of Th17 cells polarized in these in vitro conditions. This fact is related with a nonpathogenic/anti-inflammatory phenotype, since conversion of Th17 to a Th1 phenotype can promote the pathogenic potential of these cells.

Proliferation analysis showed a greater proliferation in Th17-polarized cells than in nonpolarized cells on day 7. In addition, we confirmed that around 83 % of total cells were double positive for RORC and Ki67. Therefore, in our culture conditions, almost all RORC cells were actively proliferating. Although it has been described that Th17 cells have a low ability to proliferate and to produce IL-2 in response to combined CD3 and CD28 stimulation (Santarlaschi et al. 2012), Th17 cells polarized in our cultures show high proliferation rate and secreted IL-2. This fact could be explained in part by the increase in the expression of IL-23R during differentiation process and their capacity to answer to IL-23, cytokine associated with the expansion of Th17 subset (Zhu and Paul 2008). In addition, differences in culture conditions such as the stimulation conditions, the cytokines used in the polarization, the time of the culture, or the method used to check the proliferation, could explain this discrepancy.

In addition to previous analyses, we checked the homing capacity of the Th17 cells through the analysis of the expression of the chemokine receptor CCR6, which is the most important homing receptor for Th17 cells. This chemokine receptor allows their migration to an inflammatory microenvironment in response to CCL20 (Acosta-Rodriguez et al. 2007; Korn et al. 2009). Double-positive RORC/CCR6 cells were detected in Th17-polarized cells. These results indicate that Th17 cells polarized in our in vitro culture conditions have the capacity of respond to CCL20.

VIP plays several modulatory roles in many physiological processes in the immune system. It shows predominantly anti-inflammatory and immunomodulatory actions, modulating the innate and the adaptive responses. Related to Th subsets, it has been described that VIP is able to modulate Th1, Th2, or iTreg cells (Gomariz et al. 2006; Gutiérrez-Cañas et al. 2008; Jimeno et al. 2010, 2011). In vitro and ex vivo studies with mice demonstrated that VIP can promote the Th17 subset, over the Th1 subset (Yadav et al. 2008; Jimeno et al. 2011). Our results show that in human VIP/Th17-polarized cells, the IL-17A secretion was decreased. This decrease in IL-17A protein expression in the presence of VIP has been described previously (Jimeno et al. 2011). However, results show that VIP induces the expression of IL-17A mRNA levels. Post-transcriptional regulation mechanisms could be involved in this discrepancy, but future studies are needed to clarify this. Related to cytokine receptor expression, IL-23R mRNA expression was increased in the presence of VIP. As mentioned above, the expression of IL-23R indicates that cells are able to respond to IL-23, the cytokine necessary for the stabilization

of this subset. Although several reports have associated the overexpression of IL-23R with pathogenicity of Th17 cells (Ghoreschi et al. 2011; Lee et al. 2012; Zuñiga et al. 2013), the expression of IL-23R is not exclusive of pathogenic Th17 cells. In this sense, the increase in IL-23R expression shown in the presence of VIP could indicate a greater stabilization of Th17-polarized cells generated in these culture conditions. On the other hand, our results show that RORC, RORA, and STAT3 were significantly increased in the presence of VIP. As the lineage-defining transcription factors of the Th17 cells are RORC and RORA (Yang et al. 2008), the increase in expression of both in the presence of VIP show that this neuropeptide promotes Th17 differentiation in our culture conditions. In addition, it has been described that STAT3 is related to IL-23R, RORC, and RORA expression (Hamar et al. 2012). For this reason, an increase in STAT3 expression in cells treated with VIP could indicate that VIP supports Th17 cells. Conversely, in the presence of VIP, no differences in the expression of IL-22 were detected in the Th17-polarized cells, but were significantly less expressed than in nonpolarized cells. In this sense, it has been reported that VIP decreases IL-22 production by Th17 cells (Ding et al. 2012) but, conversely, increases IL-22 expression during mouse Th17 differentiation (Yadav et al. 2008). Regarding the heterogeneity of Th17 cells, it has been described that VIP promotes Th17 over the Th1 subset in mouse (Jimeno et al. 2011) and in a model of autoimmune diabetes (Jimeno et al. 2010). A positive correlation between IFN- γ and IL-17A and between Tbx21 and RORC was observed in Th17-polarized cells. This may indicate a slight tendency toward a Th1 shift in the present culture conditions. Recent studies highlight the importance of the plasticity of Th17 cells in the Th1 phenotype (Lee et al. 2008; Lexberg et al. 2010; Hirota et al. 2012; Sundrud and Trivigno 2013). Conversion of Th17 to the Th1 phenotype might contribute to the pathogenic potential of these cells. Analysis of the Th17/Th1 profile in the presence of VIP showed that these correlations were negative in VIP/Th17-polarized cells, which also show a decrease in RORC⁺/T-bet⁺ double-positive cells, indicating that in the presence of VIP, Th17 cells are less prone to differentiate to a Th1 pathogenic phenotype (Fig. 8).

It has been shown that VIP inhibits proliferation of human CD4⁺ T cells and mouse erythrocyte-depleted spleen cells (Delgado et al. 1996; Jimeno et al. 2011). However, in human, VIP can act as an inducer or inhibitor of proliferation in different human cells (Hamar et al. 2012). Our results using BrdU indicate that VIP promotes the proliferation rate of Th17-polarized cells at day 7. Moreover, we determined the cell viability on day 7 and found no differences between Th17-polarized cells and VIP/Th17-polarized cells. Thus, we confirmed that the VIP effect was due to a proliferation increase and not a cell viability increase. Conversely, the analysis of Ki67/RORC double-expressing cells showed that

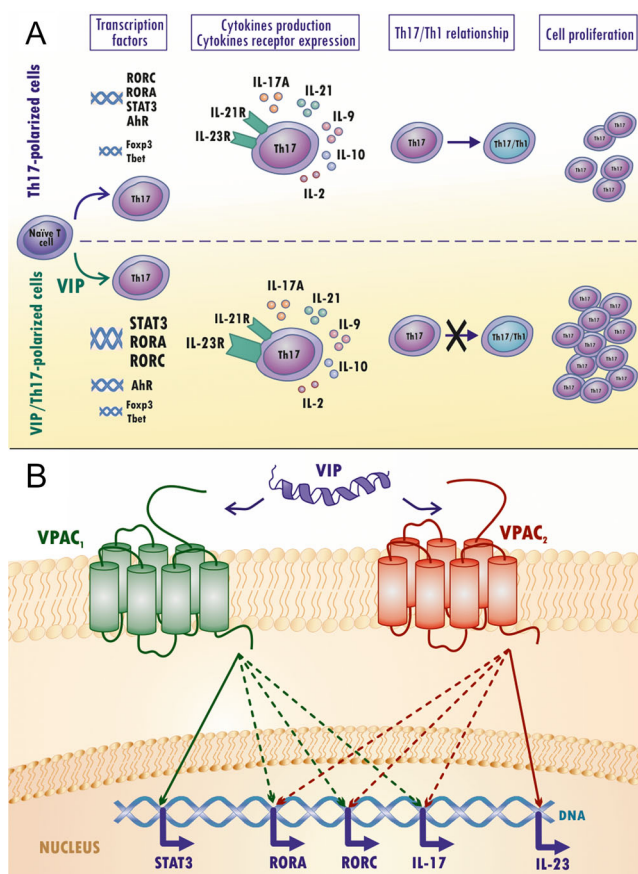


Fig. 8 Schematic representation of VIP effect on human Th17-polarized cells from naïve T cells. **a** The presence of VIP during human Th17 differentiation maintains Th17 commitment significantly enhancing IL-23R, RORC, RORA, and STAT3 expression; reduces the Th1 potential of Th17 cells; and increases the Th17 proliferation rate. **b** VIP presence during human Th17 polarization upregulates the expression of several molecules through its receptors VPAC₁ and VPAC₂. RORA, RORC, or IL-17A expression are upregulated by VIP through VPAC₁ and VPAC₂ receptors; IL-23R expression is upregulated by VIP through the VPAC₂ receptor; and STAT3 expression is upregulated by VIP through VPAC₁

this expression in the presence of VIP is not altered. This is not unexpected since BrdU is incorporated into DNA only during the S phase of the mitotic process whereas Ki67 is expressed for its whole duration. Therefore, a possible effect of VIP only during the S phase could be lost in Ki67 expression analyses given the high expression levels of this protein in Th17-polarized cells. In summary, the presence of the VIP caused an increase in the proliferation rate of Th17-polarized cells (Fig. 8). This result is according to above mentioned results and they indicate that VIP promotes the Th17 population in our culture conditions. These findings are consistent with previous *in vitro* and *ex vivo* studies in mice that demonstrated that VIP can promote the Th17 subset (Yadav et al. 2008; Jimeno et al. 2011). In addition, studies with different mice models of autoimmune diseases have shown that VIP is able to promote the Th17 differentiation *in vivo* (Abad et al. 2005; Leceta et al. 2007). Taking account that there are endogenous

sources of VIP, as nerves fibers and immune cells, this neuropeptides could modify human Th17 profile *in vivo*.

In relation to VIP receptor expressions, CD4⁺ T cells have been studied previously (Vomhof-Dekrey and Dorsam 2008; Dorsam et al. 2011). Our results demonstrate the interesting finding that the VPAC receptor pattern changed in our cultures. Unlike naïve Th cells, Th17-polarized cells predominantly express the VPAC₂ receptor. It has been described that naïve human and mouse CD4⁺ T cells predominantly express the VPAC₁ receptor and after clonal expansion there is a downregulation of this receptor (Vomhof-Dekrey and Dorsam 2008; Dorsam et al. 2011). Changes in the pattern of VIP receptors with the degree of activation/maturation of the cells have been described (Juarranz et al. 2008; Vomhof-Dekrey and Dorsam 2008; Dorsam et al. 2011). Although an increase in the VPAC₂/VPAC₁ ratio was observed in nonconditioned cells, this increase was significantly higher in Th17-polarized cells. In addition, Yadav et al. noted that VIP-induced Th17 differentiation was mainly mediated through the VPAC₁ receptor (Yadav et al. 2008). In addition, in our cultures, the high levels of VPAC₁ expression in naïve cells may be involved in the differentiation process. Differential expression of VIP receptors in human Th cells is poorly understood and future studies are needed to clarify whether Th17-polarized cells express more VPAC₂ or VPAC₁. Conversely, we tested the specificity of VIP receptors involvement in the effect of VIP during Th17-polarization using specific agonists and antagonist (Fig. 8). The specific agonists for VPAC₁ and VPAC₂ were previously and extensively used with a high affinity for each receptor subtype (Couvineau and Laburthe 2012; Harmar et al. 2012). The specific VPAC₁ antagonist, [AcHis¹DPhe²K¹⁵R¹⁶L²⁷VIP (3-7)/GRF (8-27)], has 200- to 1,000-fold greater affinity for the human VPAC₁ than for the human VPAC₂ receptor. However, it does not stimulate the adenylate cyclase activity of any membrane preparation in a concentration range from 0.1 to 10,000 nM (Gourlet et al. 1997; Ceraudo et al. 2012). As a consequence, this antagonist does not induce a biological effect *per se* (Baun et al. 2011). By examining the functionality of VPAC receptors, we can conclude that the expressions of important molecules of Th17 cells such as RORA, RORC, or IL-17A are upregulated by VIP through VPAC₁ and VPAC₂ receptors. Meanwhile, VIP exerts upregulation of IL-23R, a crucial molecule for Th17 stabilization in the late stages of Th17 differentiation, through the VPAC₂ receptor. However, the VPAC₁ receptor was shown to mediate STAT3 upregulation, according to a previous study that describes the effect of VIP on STAT3 in human renal cell carcinoma (Vacas et al. 2012).

In conclusion, our results demonstrate that VIP may maintain the nonpathogenic/anti-inflammatory profile of human Th17 cells; increase their proliferation rate; and reduce the Th1 potential of these cells. In addition, Th17 differentiation induces a switch in VPAC receptor expression pattern. These

results highlight a novel translational view in inflammation/autoimmune diseases, which adds new reasons to consider VIP as a therapeutic agent with great potential in the clinical setting.

Acknowledgments This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI11/00195, PI12/00758 and RETICS RD08/0075, RD12/0009/0002) within VI PNDE I+D+I by FEDER funds from EU and S2010/BMD-2350 from Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) and by grants from the ISCIII to RJ and MC, and the FPI grants from Ministerio de Economía y Competitividad to SPG. Thank you to the Transfusion Center of CAM and healthy donors for human cord blood samples.

References

- Abad C, Juarranz Y, Martínez C, Arranz A, Rosignoli F, García-Gómez M et al (2005) cDNA array analysis of cytokines, chemokines and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP. *Inflamm Bowel Dis* 11:674–684
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A et al (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639–646
- Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB et al (2007) TH17 cells contribute to uveitis and seleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 13:711–718
- Arranz A, Abad A, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C, Gomariz RP (2008) Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 15:46–53
- Baun M, Hay-Schmidt A, Edvinsson L, Olesen J, Jansen-Olesen I (2011) Pharmacological characterization and expression of VIP and PACAP receptors in isolated cranial arteries of the rat. *Eur J Pharmacol* 670:186–194
- Beriou G, Brandshaw EM, Lozano E, Costantino CM, Hastings WD, Orban T et al (2010) TGF beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol* 185:46–54
- Bi Y, Yang R (2012) Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions. *Scand J Immunol* 75:543–552
- Calafat M, Larocca L, Roca V, Hauk V, Pregi N, Nessi A et al (2009) Vasoactive intestinal peptide inhibits TNF-alpha-induced apoptotic events in acinar cells from nonobese diabetic mice submandibular glands. *Arthritis Res Ther* 11:R53
- Ceraudo E, Hierso R, Tan YV, Murail S, Rouyer-Fessard C, Nicole P et al (2012) Spatial proximity between the VPAC1 receptor and the amino terminus of agonist and antagonist peptides reveals distinct sites of interaction. *FASEB J* 26:2060–2071
- Chen Z, O'Shea JJ (2008) Regulation of IL17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 41:71–78
- Couveineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol* 166:42–50
- Cua DJ, Tato CM (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:479–489
- Delgado M, Martínez C, Johnson MC, Gomariz RP, Ganea D (1996) Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 68:27–38
- Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7:563–568
- Ding W, Manni M, Stohl LL, Zhou XK, Wagner JA, Granstein RD (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide bias Langerhans cell Ag presentation toward Th17 cells. *Eur J Immunol* 42:901–911
- Dorsam GP, Benton K, Failing J, Batra S (2011) Vasoactive intestinal peptide signalling axis in human leukemia. *World J Biol Chem* 2:146–160
- Ganjlikhani M, Ghaedi K, Ahdalib A, Hosseini M, Rezaei A (2011) Optimization of human Th17 cell differentiation in vitro: evaluating different polarization factors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 47:581–592
- Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Hirahara K, O'Shea JJ (2011) T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol* 39:395–401
- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martínez C (2006) VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1070:51–74
- Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Arranz A, Carrión M, Juarranz Y, Leceta J et al (2010) Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Des* 16:1063–1080
- Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P (1997) In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. *Peptides* 18:1555–1560
- Graeber KE, Olsen NJ (2012) Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. *Inflamm Res* 61:87–96
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL et al (2008) Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 22:312–317
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR et al (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br J Pharmacol* 166:4–17
- Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Kanno Y, O'Shea JJ (2010) Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:425–434
- Hirota K, Ahlfors H, Duarte JH, Stockinger B (2012) Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17 producing cells. *EMBO Rep* 13:113–120
- Jimeno R, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Martínez C, Juarranz Y, Leceta J (2010) New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 88:734–745
- Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Pérez-García S, Carrión M et al (2011) Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells. *Immunol Cell Biol* 90:178–186
- Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP (2008) Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 58:1086–1095
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 27:485–517
- Leceta J, Gomariz RP, Martínez C, Carrión M, Arranz A, Juarranz Y (2007) Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 14:134–138
- Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO et al (2008) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92–107

- Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A et al (2012) Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13:991–999
- Lexberg MH, Taubner A, Albrecht I, Lepenies I, Richter A, Kamradt T et al (2010) IFN γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur J Immunol* 40:3017–3027
- Lodde BM, Mineshiba F, Wang J, Cotrim AP, Afione S, Tak PP et al (2006) Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 65:195–200
- Marwaha AK, Leung NJ, McMurphy AN, Leving MK (2012) TH17 cells in autoimmunity and immunodeficiency: protective or pathogenic? *Front Immunol* 3:129
- McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T et al (2007) TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390–1397
- Murphy KM, Stockinger B (2010) Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 11:674–680
- O'Shea JJ, Paul WE (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science* 327:1098–1102
- Santarasci V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavalieri D et al (2012) Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity* 36:201–214
- Smalley SG, Barrow PA, Foster N (2009) Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol* 157: 225–234
- Sundrud MS, Trivigno C (2013) Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions. *Semin Immunol* 25:263–272
- Vacas E, Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Schally AV, Prieto JC et al (2012) Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits human renal cell carcinoma proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1823:1676–1685
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC et al (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106–109
- Vomhof-Dekrey EE, Dorsam GP (2008) Stimulatory and suppressive signal transduction regulates vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VPAC-1) in primary mouse CD4 T cells. *Brain Behav Immun* 22: 1024–1031
- Yadav M, Rosenbaum J, Goetzl EJ (2008) Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J Immunol* 180:2772–2776
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y et al (2008) T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28:29–39
- Zhu J, Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood* 112:1557–1569
- Zhu J, Paul WE (2010) Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 238:247–262
- Zuñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ (2013) Th17 cell development from the cradle to the grave. *Immunol Rev* 252:78–88

Artículo 4

Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect.

Rebeca Jimeno, Javier Leceta, Marina Garín, Ana M. Ortiz, Mario Mellado, Carmen Martínez, Selene Pérez-García, Rosa P. Gomariz, Yasmina Juarranz.

Journal of Leukocyte Biology
(*En revision*)

Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect

Rebeca Jimeno, * Javier Leceta, * Marina Garín, ¶ Ana M. Ortiz, # Mario Mellado, § Carmen Martínez, † Selene Pérez-García, * Rosa P. Gomariz, * Yasmina Juarranz*¹

*Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ¶ División de Terapias Innovadoras en el S. Hematopoyético, CIEMAT/CIBERER. Unidad Mixta de Terapias Avanzadas CIEMAT/IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; # Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Princesa, Madrid, Spain; § Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; † Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. Rosa P. Gomariz and Yasmina Juarranz share senior authorship.

ABSTRACT

Several studies in humans indicate derangement of Th17 cells in rheumatoid arthritis [RA]. Therapies targeting their pathogenicity, as well as their plasticity to the Th17/1 phenotype, could improve the effects from this pathology. Moreover, the neuroendocrine environment has been suggested as an important milieu conditioning the differentiation of lymphoid cells. Vasoactive Intestinal Peptide [VIP] is present in the joint microenvironment and its therapeutic effects are supported by several studies on RA. We examine the ability of VIP to modulate the Th17 phenotype. Blood CD4⁺CD45RO⁺ T cells from healthy donors and early RA [eRA] patients were expanded in a Th17-polarizing environmental medium in the presence of TGFβ. After seven days, the higher IL-17A, IL-21 and IL-9 levels, and lower IL-22 levels, indicate a non-pathogenic profile for Th17 cells in healthy donors. However, Th17 cells from

eRA patients produced significantly more IL-22 and IFNγ and a Th17/1 profile, indicating a pathogenic phenotype. VIP increases the non-pathogenic profile of Th17-polarized cells, as shown by higher IL-10 and IL-9 levels in both samples and lower IL-22 levels in eRA cells. A decrease in the Th17/1 profile and an increase in the Treg/Th17 profile of memory Th cells polarized towards the Th17 subset were induced by VIP. Regarding VIP receptors, the ratio VPAC2/VPAC1 is higher in eRA patients. In conclusions, this report addresses a novel and interesting question on the effect of VIP on the pathogenesis of human Th17 cells and adds clinical relevance to this question by analyzing in parallel healthy donors and eRA patients.

Introduction

Rheumatoid arthritis [RA] is an autoimmune disease that results in chronic inflammation and tissue damage in the joints. T and B cells have been implicated in the pathogenesis of RA. While autoantibodies to immunoglobulins and citrullinated peptides play a central role in generating joint-specific inflammation [1], the role of different autoreactive T cell subsets has been the subject of an intense debate. Once arthritogenic function was attributed to Th1 cells, the subsequent discovery of the Th17 subset indicated a central role for these cells in this pathology, recently becoming a target for the treatment of the disease [2-4]. Th17 levels in peripheral blood are

Abbreviations: ACAP=Anti-Citrullinated Protein Antibodies, ACR= American College of Rheumatology, CCR6= Chemokine Receptor 6, CIA= Collagen Induced Arthritis, DAS28= Disease Activity Score 28, EAE= Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, ELISA= Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, eRA= Early Rheumatoid Arthritis, EULAR= European League Against Rheumatism, Foxp3= Forkhead box P3, GM-CSF= Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, HD= Healthy Donors, IFNγ= Interferon gamma, IL-1β= Interleukin 1 beta, IL-2= Interleukin 2, IL-6= Interleukin 6, IL-9= Interleukin 9, IL-10= Interleukin 10, IL-17= Interleukin 17, IL-21= Interleukin 21, IL-22= Interleukin 22, IL-23= Interleukin 23, iTreg= Induced regulatory T cells, PBMCs= Peripheral Blood Mononuclear Cells, RA= Rheumatoid Arthritis, SD= Standard Deviation, RORα= RAR-related Orphan Receptor A, RORγ= RAR-related Orphan Receptor C, STAT3= Signal Transducer and Activator of Transcription 3, Tbx21= T-box transcription factor 21, TGFβ= Transforming Growth Factor beta, Th cells= T helper cells, Th1 cells= T helper 1 cells, Th2 cells= T helper 2 cells, Th17 cells= T helper 17 cells, Treg= Regulatory T cells, VIP= Vasoactive Intestinal Peptide, VPAC1= Vasoactive intestinal peptide receptor type 1, VPAC2= Vasoactive intestinal peptide receptor type 2

1. Correspondence: Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. C/José Antonio Novais 12, 28040 Madrid, Spain. Email: yashina@bio.ucm.es

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/us/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

associated with disease activity and IL-17 levels are increased in the synovial fluid of RA patients [5-8]. IL-17 is a key orchestrator of the chronicity of RA. However, other molecules have been tested in reporting the presence of Th17 cells in RA including the transcription factor RORC, the major lineage-specifying transcription factor for Th17 subset development [9], and the chemokine receptor CCR6, associated with the capacity of Th17 cells to move towards inflammatory joints [3,10]. It was found that in both the peripheral blood of healthy donors [HD] and the synovial fluid of RA patients, all IL-17-producing T cells expressing RORC were CCR6+ [11]. In addition, other transcription factors are strongly associated with the Th17 subset, such as RORA or STAT3 [9,12]. In addition, recent reports indicate the heterogeneity of cytokines secreted by these cells, reflected in a diversity of phenotypes [10]. Th17 cells have been proposed to include both pathogenic and non-pathogenic cells according to polarization conditions and the cytokines produced [13,14]. While IL-6 is necessary for the development of both cell phenotypes, the presence of TGF β determines the development of non-pathogenic Th17 cells [14]. A pathogenic phenotype is responsible for the transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis [EAE] in mice, while the non-pathogenic phenotype does not transfer EAE [15]. All of these aspects have been addressed in the differentiation of Th17 cells from naïve CD4 T cells, but less is known about their heterogenic activity in memory Th cells. Other characteristics of Th17 cells indicate their partial plasticity, since these cells may be converted to a Th1-like phenotype, associated with a pathogenic Th17 phenotype [14,16]. However, Th17 polarization conditions in the presence of TGF β were related to a decrease in the potential of Th17 cells to undergo changes in their lineage commitment to Th17/1 and Th1 subsets [10,14]. Aside from the phenotypic plasticity of Th17 cells toward a Th1-like condition, the instability of regulatory T [Treg] cells and their shift to Th17 cells under pathogenic conditions have been recently described. Indeed, the non-pathogenic phenotype of Th17 cells is more strongly associated with an induced Treg [iTreg] profile [10,14].

Taking all these considerations into account, it is important to understand the regulation of the pathogenicity/plasticity of memory Th17 cells in RA, that may contribute to the design of new therapies. Of particular importance in this aspect is the influence of extracellular environment. The neuroendocrine milieu has been suggested as an essential factor conditioning the differentiation of lymphoid cells. Vasoactive intestinal peptide [VIP] is one of the best studied immunoregulatory peptides, modulating both innate and adaptive immunity. It functions through binding to its specific receptors VPAC1 and VPAC2. Both receptors are expressed in lymphoid cells, specifically in CD4 T cells [17-19]. However, while VPAC1 is constitutively expressed, VPAC2 is induced after cell activation [20]. VIP modulates immune responses showing a predominantly anti-inflammatory action and a potent immunoregulatory action, by decreasing the Th1/Th2 cytokine ratio and promoting T regulatory functions [17,18]. Its effects could also be mediated by the regulation of Th17 function

[21,22]. It has been shown that this neuropeptide prevents the development of CIA, curbing bone destruction [23,24]. In human RA, VIP is present in the joint microenvironment and its therapeutic effects have been supported by several studies [18,25-28]. Recently, circulating VIP levels have been described as a prognostic biological marker predicting the evolution of early RA [eRA] patients [29].

To date, phenotypic and functional studies and clinical trials in humans, indicate the derangement of Th17 cells in RA [30-31]. Therapies targeting their pathogenicity, as well as their plasticity to the Th17/1 phenotype, could improve the effect on this pathology. In this study, we analyse the phenotype of memory Th cells from the peripheral blood of eRA patients and HD expanded in a Th17-polarizing environmental medium in the presence of TGF β and the ability of VIP to promote their non-pathogenic phenotype. Study in RA patients of recent onset allows to reproduce in vitro what might occur in patients with eRA in the active phase of the disease. Thus, since eRA patients are naïve-treatment patients, we avoid treatment interferences in our study.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Samples from thirteen HD and fourteen eRA patients were included in this study. The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committees of the Transfusion Center of Comunidad Autónoma de Madrid [CAM] and La Princesa and 12 de Octubre hospitals [Madrid]. Only data from patients fulfilling the 2010 ACR/EULAR criteria for eRA were collected [32]. Blood samples were collected previous to treatment prescription. HD were recruited from the Transfusion Center. Following the Spanish Personal Data Protection law, their demographic information was confidential. Among eRA patients, there were two males and twelve females, 71.4% tested positive for ACPA, the mean age was 56.4 \pm 4.2 years [mean \pm SD] and the mean DAS28 was 4.1 \pm 0.6 [mean \pm SD].

Isolation of human peripheral blood human memory Th cells

Memory Th cells were isolated from whole blood from HD and eRA patients. For mononuclear cell isolation, density gradient centrifugation by Ficoll-Hypaque [Sigma Aldrich] was used. CD4+ T cells were isolated by negative selection using a CD4+ T Cell Isolation Kit II [Miltenyi Biotec]. CD4+CD45RO+ T cells were then isolated by negative selection using CD45RA+ MicroBeads [Miltenyi Biotec]. The purity of CD4+CD45RO+ T cells was greater than 92%.

In vitro Th17 cell polarization

CD4+CD45RO+ T cells from HD and eRA patients were cultured in RPMI-1640-GlutaMAX media [Life Technologies] supplemented with 10% fetal bovine serum [Lonza] and 1% penicillin/streptomycin [Life Technologies]. Cells were expanded with anti-CD3/anti-CD28 coated beads [Life Technologies]. Three types of cultures were established= non-polarizing conditions; Th17-polarizing conditions in the presence of human recombinant TGF β [2ng/ml] [eBioscience], human recombinant IL-23 [10ng/ml] [eBioscience], human recombinant IL-6 [10ng/ml] [eBioscience], human recombinant IL-1 β [10ng/ml] [eBioscience], anti-IL-4 [2 μ g/ml] [BD Pharmingen] and anti-IL-12p35 [2 μ g/ml] [R&D System]; and VIP/Th17-polarizing conditions as above plus 10nM of VIP [Polypeptide Group].

RNA extraction and semi-quantitative real-time PCR

For total RNA extraction we used the TriReagent method [Sigma Aldrich]. 2 μ g RNA were reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit [Life Technologies]. Semi-quantitative RT-PCR analysis for all molecules tested was performed using TaqMan Gene Expression Master Mix [Life Technologies], with the exception of IL-22, which was tested using SYBR β Green PCR Master Mix [Life Technologies] [33]. β -actin was used as an endogenous reference gene. We normalized each sample with β -

actin, using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Amplification was performed in a 7900HT Fast RT-PCR Systems apparatus [Applied Biosystem].

Measurements of cytokines

Cells were restimulated on day 7 with 20ng/ml phorbol myristate acetate [PMA] and 0.5μM ionomycin [Sigma Aldrich] for six hours. The levels of IL-17A, IL-21, IL-22, IFNγ, IL-9 [eBioscience] and IL-10 [Diacor] in supernatants were analyzed by ELISA. Final values were corrected considering the final volume of the cultures and the number of viable cells in each sample.

Flow cytometry analysis

After seven days of culture, cells were collected and labelled with Phycoerythrin-conjugated CCR6 [clone 11A9, BD Pharmingen]. Cells were then fixed and permeabilized with Transcription Factor Buffer Set [BD Pharmingen] according to the manufacturer's specifications. Next, cells were labelled with Allophycocyanin-conjugated RORC [clone AFKJS-9, eBioscience] and Brilliant Violet 711-conjugated Ki67 [clone Ki-67, BioLegend]. Auto-fluorescence and isotype controls were set up to define non-specific fluorescence. Cytometric analysis was performed using a LSR Fortessa flow cytometer [Becton Dickinson, using BD FACSDiva software]. Data analysis was performed using FCS Express v3 [De Novo Software].

Immunocytochemistry staining

On day 7, cell suspensions were centrifuged onto glass slides, dried and fixed. After rehydration and blocking, cells were incubated with 0.02mg/mL rabbit anti-VPAC1 polyclonal antibody and mouse anti-VPAC2 monoclonal antibody [Acris Antibodies]. Cells were then incubated with 1μg/mL Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG antibodies [Life Technologies] and counterstained with 1μg/ml Hoechst. Fluorescence was examined on an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model [Olympus] and a Leica SP-2 AOBs confocal microscope with inverted stand Leica DM IRE2 [Leica].

Statistical analysis

Samples were tested for normality with a normality test. The t-test was used to compare different cell populations and correlations were conducted using Pearson's coefficient test. Statistical tests were done using GraphPad Prism version 4.0 software [GraphPad Software].

RESULTS

Higher frequency and proliferation rate of Th17-polarized cells in eRA patients.

Results showed that the percentage of total positive RORC cells in memory Th cells from eRA patients and HD cultured in the presence of Th17 polarization factors, including TGFβ, was significantly higher compared to HD [Figure 1A]. This indicated a greater incidence of Th17 subset in eRA patients. On the other hand, the percentage of double positive CCR6 and RORC cells was similar in HD and eRA patients, indicating that the capacity of migration of Th17 cells was maintained in both sample types [Figure 1A]. The percentage of proliferating Th17-polarized cells was also determined. Around 60% of these cells were proliferating in Th17-polarized cells from eRA patients, as indicated by the presence of double positive Ki67/RORC cells [Figure 1B]. This percentage was significantly lower in HD respect to eRA patients. In summary, the Th17-polarized cells from eRA patients are more abundant and have higher proliferative rate than cells from HD.

Th cells from eRA patients are prone to polarize to a Th17 pathogenic profile.

We characterized the expression of cytokines, cytokine receptors and transcription factors of memory Th cells from HD and eRA patients expanded favouring Th17 polarization, under the

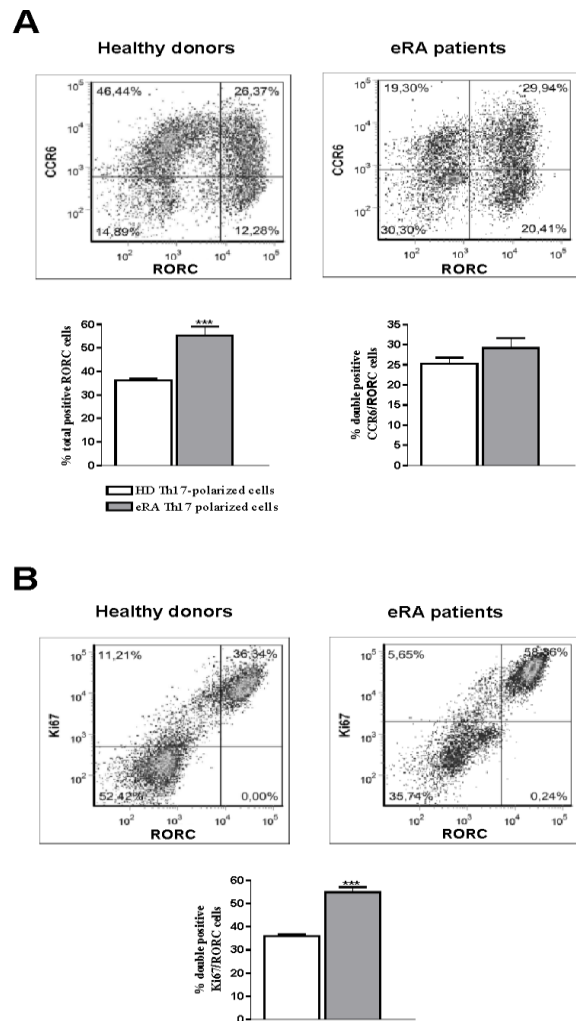


Figure 1. Higher frequency and proliferation rate of Th17-polarized cells in eRA patients. Expression of RORC, CCR6 and Ki67 was determined by flow cytometry analysis in Th17-polarized cells from HD and RA patients. Auto-fluorescence and isotype controls were set up to determine the non-specific fluorescence signal. Percentage of total RORC-positive cells and double positive CCR6/RORC and Ki67/RORC cells was quantified. [A] Two representative dot plot analyses are shown for Th17-polarized cells from HD and eRA patients. Diagrams of the percentage of total RORC positive cells and double CCR6/RORC positive cells are shown. [B] Two representative dot plot analyses are shown for Th17-polarized cells from HD and eRA patients. Diagram of the percentage of double Ki67/RORC positive cells is shown. Data are the mean ± SEM of three different cultures performed in triplicate. Differences between Th17-polarized cells from HD and from eRA patients were statistically significant, ***P<0.001.

influence of TGFβ, IL-23, IL-1β and IL-6 with antibodies to neutralize IL-12 and IL-4. In HD, the expansion of CD4⁺CD45RO⁺ T cells under these conditions resulted in an increase in IL-17A, IL-21 and IL-9 production, compared with cells expanded without added cytokines and antibodies. Meanwhile, the levels of IL-22, GM-CSF and IL-10 were reduced in these cells [Table 1]. These results may indicate a non-pathogenic profile of Th17 cells in HD, suggested mainly by the reduction of IL-22 and GM-CSF levels and by the increase in IL-9 secreted. However, Th17-polarized cells from eRA patients showed a more pathogenic phenotype than memory Th cells expanded under non-polarized conditions, although TGFβ was present in the culture. Comparing Th17-polarized cells from HD and eRA patients, the latter

Table 1. Th17 cytokine expression in memory T cells from HD and eRA patients after Th17-polarization in the presence of TGFβ compared with non-polarized cells.

Cytokines	Healthy donors		eRA patients	
	Non-polarized cells	Th17-polarized cells	Non-polarized cells	Th17-polarized cells
IL-17A	0.28 ± 0.06	0.92 ± 0.08***	0.70 ± 0.14	1.99 ± 0.37**
IL-21	1.54 ± 0.20	3.04 ± 0.32***	0.99 ± 0.08	4.02 ± 0.83**
IL-22	8.42 ± 1.22	1.12 ± 0.13***	7.43 ± 0.83	4.11 ± 1.29
GM-CSF	11.8 ± 1.37	1.88 ± 0.37***	9.73 ± 1.51	1.97 ± 0.22***
IL-9	0.29 ± 0.06	4.97 ± 0.55***	0.19 ± 0.03	4.91 ± 1.04***
IL-10	4.68 ± 0.99	2.08 ± 0.47*	3.34 ± 0.29	2.15 ± 0.37*

Protein expression of IL-17A, IL-21, IL-22, GM-CSF, IL-9 and IL-10 was analysed in culture supernatants by ELISA on day 7 of culture. Data (ng cytokine/10⁶ cells) are the mean ± SEM of 8 different cultures, performed in duplicate. Differences between Th17-polarized cells and non-polarized cells were statistically significant, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

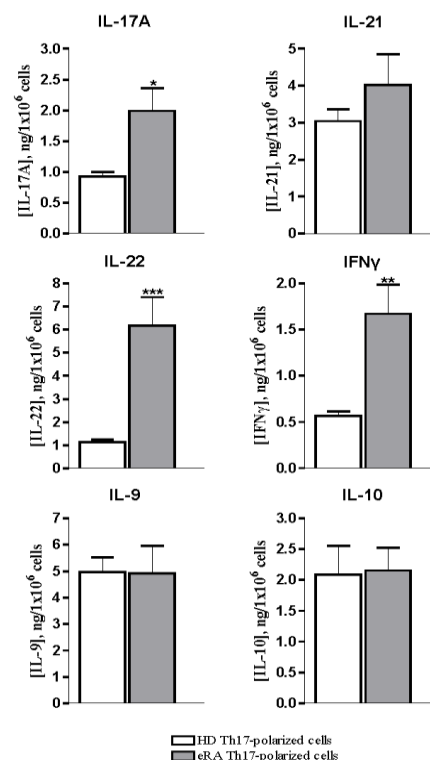
produced significantly more IL-17A, IL-22 and IFNγ [Figure 2A]. In addition to cytokine levels, mRNA expression of IL-17A, IL-21, IL-22 and IL-2 cytokines were checked. Results show that IL-22 and IL-2 expression were higher in eRA patients than in HD [Figure 2B]. Also, other markers of Th17 subset [RORC, RORA and STAT3] were detected. Comparing the expression of these markers, a higher mRNA expression of all transcription factors in eRA patients was evident [Figure 2B]. In summary, the increase in RORC, RORA and STAT3 expression, along with IL-2 and IL-22 expression, confirm that Th17-polarized cells from eRA patients show a more commitment to Th17 profile and a greater pathogenic phenotype.

Th17/1 and iTreg/Th17 profiles.

To analyze the Th17/1 profile, we checked the expression of Th1 markers. A skew towards a Th1-like condition is reflected in eRA patients by the increase in IFNγ [Figure 2A] and in the ratio IFNγ/IL-17A [Figure 3A] compared to HD, indicating that the amount of IFNγ is higher than IL-17 in eRA patients. We also checked the mRNA expression Tbx21[T-bet], the master transcription factor of Th1 subsets. In HD, Tbx21 expression in Th17-polarized cells was drastically reduced to almost undetectable levels in culture conditions favouring Th17 cells compared to non-polarized conditions [data not shown]. Meanwhile, Tbx21 expression was higher in non-polarized cells from eRA patients than HD [2.92±0.48 versus 1.19±0.19]. Under Th17-polarized conditions, detectable levels of Tbx21 expression in eRA patients were still present, and were significantly higher than those in HD, suggesting a probable shift from a Th17 to a Th17/1 profile that is not seen in HD [Figure 3A].

In relation to Treg and Th17 plastic relationships, we studied the IL-10/IL-17A ratio and the Foxp3 expression in our culture in the presence of Th17 polarization factors, including TGFβ, [Figure 3B]. Memory CD4 T cells from eRA patients showed a significantly higher expression of Foxp3 than cells from HD. However, the ratio IL-10/IL-17A was smaller in eRA patients, suggesting that the Treg function may be impaired.

A



B

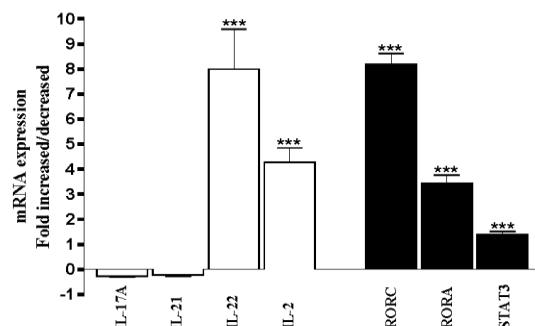


Figure 2. Th17 cells from eRA patients are prone expand to a pathological cell population. Human memory Th cells from HD and eRA patients were polarized to the Th17 subset in the presence of Th17 polarization factors, including TGFβ, and were checked on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for six hours. [A] Protein expression of IL-17A, IL-21, IL-22, IFNγ, IL-9 and IL-10 was analysed in culture supernatants by ELISA. [B] mRNA expression of

IL-17A, IL-21, IL-22, IL-2, RORC, RORA and STAT3 was determined by RT-PCR. Data from HD and eRA patients were normalized with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of non-polarized cells from HD. The fold change of mRNA expression in eRA patients with respect to HD is represented. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures, performed in duplicate or in triplicate, for ELISA and RT-PCR analysis, respectively. Differences between Th17-polarized cells from HD and eRA patients were statistically significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

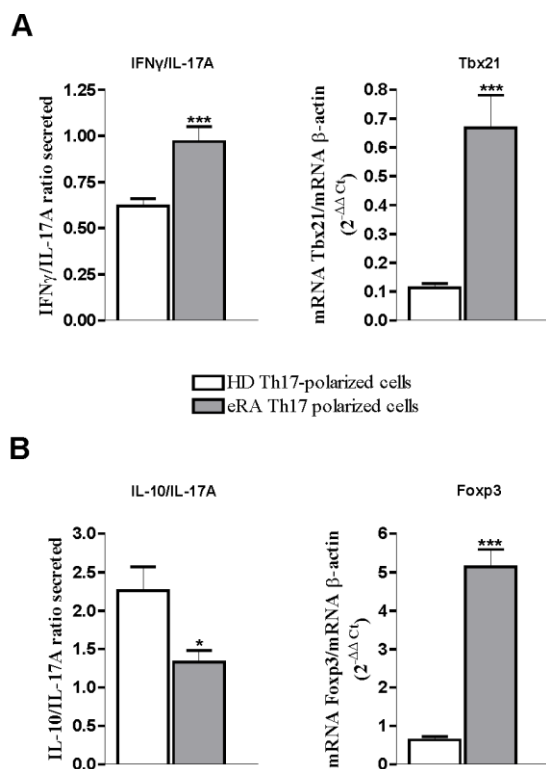


Figure 3. Th17/1 and iTreg/Th17 profile of memory Th cells. Memory human Th cells from HD and eRA patients were polarized to the Th17 subset in the presence of Th17 polarization factors, including TGF β , and were checked on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for six hours. Protein expression of IFN γ , IL-10 and IL-17A was analysed in culture supernatants by ELISA. The IFN γ /IL-17A ratio [A] and IL-10/IL-17A ratio [C] are shown. mRNA expression of Tbx21 [B] and Foxp3 [D] were determined by RT-PCR. Data from HD and eRA patients were normalized with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of non-polarized cells from HD. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures, performed in duplicate or in triplicate, for ELISA and RT-PCR analysis, respectively. Differences between Th17-polarized cells from HD and from eRA patients were statistically significant, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

VIP increases the non-pathogenic profile and promotes the migration capacity of Th17-polarized cells.

To study whether VIP influences Th17-polarized cells from eRA patients, we checked several parameters, in the presence and absence of VIP during the differentiation of CD4+CD45RO+T cells. The presence of VIP seemed to potentiate the activity of Th17 cells, indicated by the greater mRNA expression of several of the Th17 markers [Figure 4A]. Interestingly, its effect was different in HD and eRA patients. In HD, VIP increased IL-17A, IL-21 and RORC, and reduced the mRNA expression of IL-23R. In eRA patients, VIP augmented IL-17A, RORC and

Foxp3 expression and decreased the mRNA expression of IL-22. In addition to mRNA analysis, several cytokines were examined in culture supernatants [Figure 4B]. The presence of VIP augmented the levels of IL-17A, IL-21, IL-9 and IL-10 in HD. In eRA patients, the production of IL-22 was reduced and a tendency to increase was observed for IL-9 and IL-10 levels. On the other hand, we analyzed the VIP effect on the capacity of Th17-polarized cells migration. Results show that the presence of VIP during Th17 polarization significantly increased the percentage of double positive CCR6 and RORC cells in eRA patients compared to HD [35.3 \pm 1.88 and 28.1 \pm 0.50, respectively].

VIP decreases the Th17/1 profile and increases the Treg/Th17 profile.

In relation to Th17/1 profile, we analysed the correlations between Tbx21 and RORC transcription factors [Figure 4C]. The expression of the two transcription factors is not correlated in either HD or eRA patients. However, the presence of VIP in the cultures significantly induces a negative correlation in Th17-polarized cells from HD and eRA patients. These results indicate that, under conditions favouring Th17 commitment, VIP inhibit their bias to Th1-like cells.

In regards to the Treg/Th17 profile, the presence of VIP in the culture significantly increased by 1.5-fold the IL-10/IL-17A ratio in the Th17-polarizing culture supernatants from eRA patients [1.33 \pm 0.15 versus 2.03 \pm 0.25 in the absence or presence of VIP, respectively]. No significant changes were observed in cells from HD. In addition, correlations between Foxp3 and RORC transcription factors were determined [Figure 4D]. In the absence of VIP, no correlations were shown in either HD or eRA patients. However, in the presence of VIP a statistically significant positive correlation was observed in both, suggesting that VIP shift the bias toward a regulatory phenotype.

Higher VPAC2/VPAC1 ratio in Th17-polarized cells from eRA patients.

Protein expression of VPAC receptors was determined by immunocytochemical analysis [Figure 5A]. Both receptors were expressed in memory Th cells from HD and eRA patients. Single and double stained cells were observed. mRNA expression of both receptors and the VPAC2/VPAC1 ratio was also analysed [Figure 5B]. VPAC1 and VPAC2 receptors were expressed at equivalent levels in both HD and eRA patients. However, the VPAC2/VPAC1 ratio was significantly higher in eRA patients than in HD.

DISCUSSION

The discovery of Th17 cells presented a new perspective on the pathology and therapeutic targets in RA. The present study demonstrates that memory Th cells from eRA patients polarized to Th17 cells are more pathogenic than those of HD. In addition, it establishes that VIP, a neuropeptide present in the joint microenvironment, is able to modify these cells

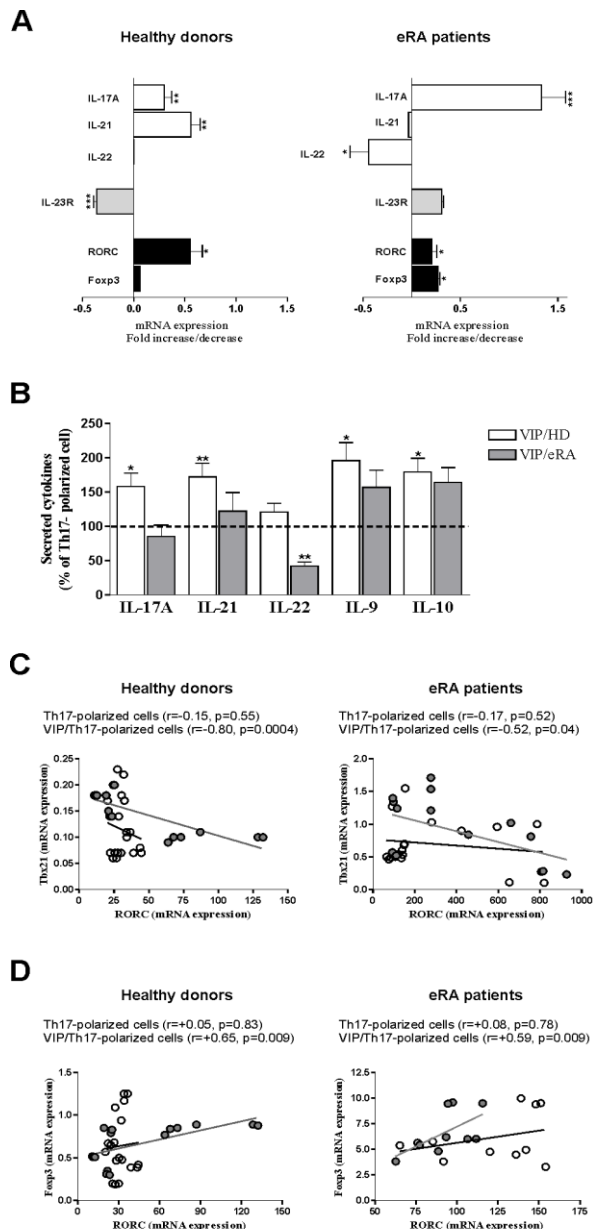


Figure 4. VIP increases the non-pathogenic and the iTreg/Th17 profile and decreases the Th17/1 profile of Th17-polarized cells. Human memory Th cells from HD and eRA patients were polarized to the Th17 subset in the presence of VIP and were checked on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for six hours. [A] mRNA expression of several molecules was determined by RT-PCR. The fold change of expression in the presence of VIP is represented. [B] Protein expression of several cytokines was analysed by ELISA. The increase/decrease of the percentage values in the presence of VIP is shown. The dashed line indicates the values for each cytokine in the absence of VIP [100%]. [C] Correlations between mRNA expression of RORC and Tbx21 and [D] between mRNA expression of RORC and Foxp3 was determined using Pearson's coefficient test. Data from HD and eRA patients were normalized with β -actin mRNA expression and compared with the mRNA expression of non-polarized cells from HD. Data are the mean \pm SEM of eight different cultures, performed in triplicate or in duplicate, for RT-PCR analysis and ELISA, respectively. Differences between Th17-polarized cells in the presence or absence of VIP were statistically significant, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

to a non-pathogenic phenotype. Since the pathogenic effect of Th17 cells has been identified in both murine experimental models of arthritis and in RA patients [5,7,34,35], the control of pathogenic Th17 function in eRA could provide new therapeutic strategies for this pathology and other autoimmune diseases.

In humans, IL-6 and IL-1 β appear to be necessary for polarization to the Th17 subset [10]. IL-21 was also identified as an autocrine cytokine enhancing Th17 cell differentiation and proliferation [30]. Finally, IL-23, although not involved in the initial differentiation of these cells, is necessary for their survival and for full and sustained differentiation and proliferation [30]. In this study, we added these cytokines to our cultured CD4⁺CD45RO⁺ T cells along with anti-IL-12 and anti-IL-4. As these cytokines are necessary for the survival of Th1 and Th2 subsets, we expected that under this conditions, Th17 cells would be preferentially expanded. This assumption was corroborated since all RORC positive cells were cycling as indicated by flow cytometry analysis of Ki67 and RORC, and since the majority of cells cultured were CCR6 positive or RORC positive. In this respect, a higher incidence and proliferation rate of Th17 cells was found in eRA patients compared with HD. This predominance of Th17 activity in eRA is also indicated by the significantly higher levels of IL-17A.

Th17 cells have been shown to be a heterogeneous population, whose phenotype depends on different cytokines present at the time of differentiation or expansion [14,36]. A large number of genes are differentially expressed between the pathogenic and non-pathogenic Th17 profiles. Whereas both secrete similar amounts of IL-17, pathogenic Th17 cells differentially express high levels of IL-2, IL-22 and IL-23R, while the non-pathogenic subset express higher titers of IL-9 and IL-10 [13,14]. In this manner, naïve T cells in the presence of IL-6, IL-1 β and IL-23 but, in the absence of TGF β differentiate toward a population of Th17 cells responsible for the transfer or autoimmunity in a murine model of multiple sclerosis [14]. In contrast, naïve T cells polarized under identical conditions but with exogenous TGF β and without IL-23 failed to induce EAE [14]. It has been described that IL-23 signaling is essential for the expansion of pathogenic Th17 cells [15]. We added TGF β cytokine in our cultures in order to study the behaviour of memory Th cells from HD and eRA patients polarized to the Th17 subset. Our results show that HD and eRA patients have Th17 cell populations that differ in their pathologic or non-pathologic condition. They differ mostly in the expression of IL-2 and IL-22, indicating a skewed condition to the pathogenic phenotype of Th17 cells in eRA patients, although TGF β was present in the polarization medium. This fact could be due to the different baseline properties of memory Th cells.

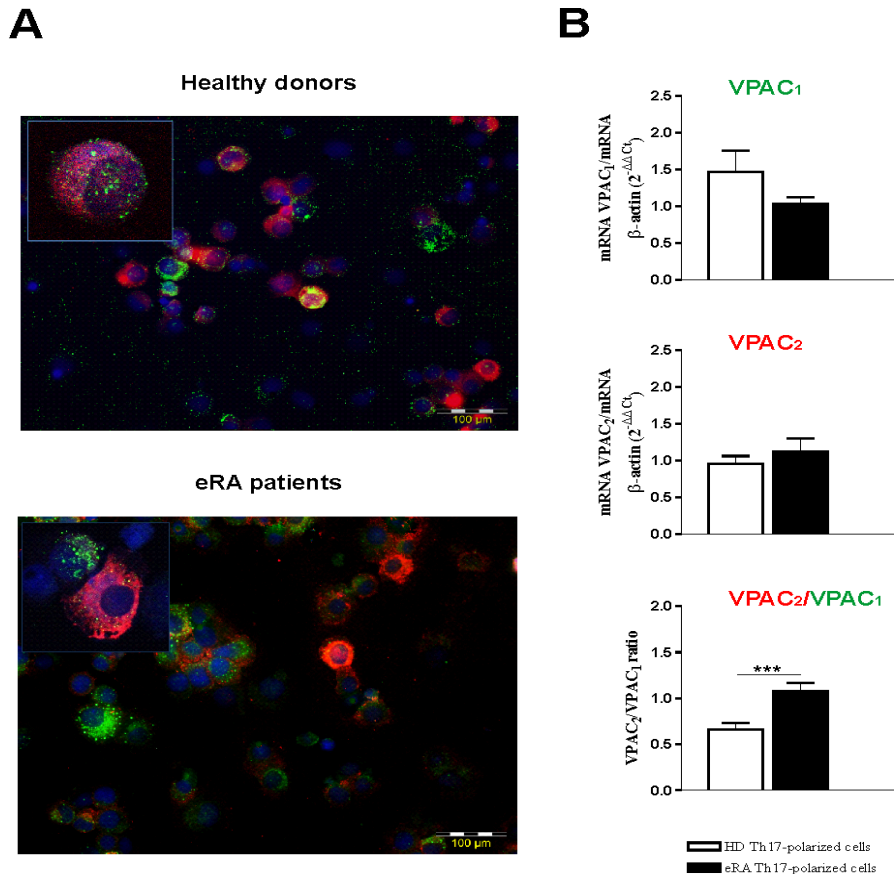


Figure 5. VPAC1 and VPAC2 expression in Th17-polarized cells. [A] Protein expression of VPAC1 and VPAC2 receptors was analysed by immunofluorescence staining. Nuclei were counterstained with Hoechst [blue] and receptors were stained with Alexa Fluor 488 [green] and Alexa Fluor 594 [red] for VPAC1 and VPAC2, respectively. Negative controls were performed in the absence of anti-VPAC1 and anti-VPAC2 antibodies. Figure shows a representative photo of Th17-polarized cells from HD and eRA patients. Fluorescence was examined on an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model [objective 40X]. Boxed areas show higher-magnification views of individual cells. Fluorescence was examined on a Leica SP-2 AOBs confocal microscope with inverted stand Leica DM IRE2 [objective 63X]. [B] The individual mRNA expression and the ratio between mRNA expression of VPAC2 and VPAC1 were determined by RT-PCR on day 7 of culture after PMA and ionomycin stimulation for six hours. Data from HD and eRA patients were normalized with β-actin mRNA expression and compared with the VPAC2 mRNA expression of non-polarized cells from HD. Data are the mean ± SEM of eight different cultures performed in triplicate. Differences between Th17-polarized cells from HD and eRA patients were statistically significant, ***P<0.001.

Th17 cells are unstable and appear to be inherently plastic and easily become Th1-like cells, particularly in models of autoimmunity [37]. Th17 cells have been shown to differentiate into IFNγ-secreting cells when they are stimulated in the presence of IL-12 [38]. This change is dependent on the expression of T-bet. Epigenetic studies show that these transitions are possible mainly due to the fact that the Tbx21 promoter exhibits bivalent modifications [39]. Double positive IFNγ/IL-17A or T-bet/RORC cells are indicators of the transition from Th17 to Th17/1 cells [40]. Since T-bet expression in Th17 cells induces the production of IFNγ, cells producing both IL-17A and IFNγ that ultimately produce only IFNγ are the main pathogenic T cells that induce autoimmune diseases [41]. In fact, it has been described that T-bet is required for autoimmune inflammation since T-bet deficient animals are resistant to autoimmunity in spite of increased numbers of IL-17 positive cells [42]. Since T-bet inhibits RORC, memory Th17 cells may lose their capacity to express IL-17. Our results demonstrate the skewing of the Th17 cells to Th1-like subset in eRA patients, not seen in HD. This is indicated by the sustained expression of Tbx21, a

higher levels of IFNγ secretion and higher IFNγ/IL-17A ratio.

Another aspect of the Th17 cells to be considered is the plasticity between iTreg and Th17 cells. Both subsets show overlap in their differentiation requirements and transcriptional programs. TGFβ signaling is required in the differentiation of both subsets and RORC and Foxp3 are transiently co-expressed early in their differentiation [37]. On the other hand, the pathogenic conversion of Foxp3+ T cells to Th17 cells in animal models of autoimmune arthritis has been described [43]. The higher expression of Foxp3 in eRA patients described in this report may be related to the higher proportion of Foxp3+ cells in peripheral blood already documented during experimental arthritis [44]. However, a lower incidence of iTreg function may be indicated in the reduced IL10/IL17A ratio observed in eRA patients compared to HD.

The effect of VIP has been extensively studied in the immune system and its function on innate and adaptive immunity has been clearly demonstrated,

having a beneficial effect on the development of several autoimmune disorders in animal models and in human RA samples [17,18,23-28,45]. Indeed, eRA patients who are unable to up-regulate VIP present a worse clinical course despite receiving more intense treatment [29]. Its effect on Th1/Th2 balance has been examined in both in vivo and in vitro studies. The results indicate that VIP increases cytokines and master regulators of the Th2 subset and lowers the Th1 subset [18,22,23,26]. Also, the influence on Th17 cells has also been studied in animal models in vivo and in vitro. Data indicate that VIP decreases the cytokines related to this cell subset [21,22,46]. However, other authors have observed a potentiation of the development of Th17 cells in vitro under the influence of VIP [47]. Thus, we study the effect of VIP on one of the main cell types implicated in human autoimmune diseases, and about its ability to modify their pathogenic profile. According to previous reports [47], our results indicate that VIP potentiates Th17 function in both HD and eRA patients, as indicated by the higher expression levels mainly of IL-17A and RORC. Indeed, VIP increases CCR6/RORC positive cells. However, the Th17 expanded cells seem to be less pathogenic given the inhibition of IL-22 in eRA patients and the inhibition of IL-23R expression and the increase in the production of IL-9 and IL-10 in HD. In addition, VIP is able to modulate Th17/1 and Treg/Th17 profiles. Related to Th17/1 profiles, Tbx21 and RORC correlated negatively in both HD and eRA patients in the presence of VIP. Lastly, the presence of VIP induces the Treg phenotype in eRA patients which showed a Foxp3 expression increased. Relationship between iTreg and Th17 cells might be inhibited in the presence of VIP since the expression of RORC and Foxp3 are positively correlated and Foxp3 and the ratio IL-10/IL-17A increases in cultures from eRA patients in the presence of VIP. Therefore, VIP could prevent the pathogenic conversion of iTreg to Th17 cells in eRA patients.

VIP exerts its effect by binding to two specific receptors, VPAC1 and VPAC2. In naïve mouse and human Th cells, VPAC1 is constitutively expressed at two to three orders of magnitude higher than VPAC2 [48]. During T cell activation, transcription of VPAC1 sharply drops [49]. In contrast, VPAC2 has been shown to be induced and becomes up-regulated after T cell activation [20]. Related to Th17 cells, it has been described that the differentiation of Th17 cells from human naïve Th cells could be mediated by both types of receptors [33]. The expression of VPAC1 in our HD cultures is two orders of magnitude higher than VPAC2 in resting memory Th cells (data not shown), as has been reported by other authors for peripheral lymphocytes from HD [49]. In Th17-polarized cells, the expression of VPAC2 predominates over VPAC1 in eRA patients. In this sense, it has been described a correlation of decreased VPAC1 expression with VIP responsiveness in activated PBMCs from RA patients and an association of VPAC1 genetic variants with RA susceptibility [50]. These facts could explain the minor effect of VIP observed in eRA patients compared to HD.

In conclusion, this report addresses a novel and interesting question on the effect of VIP on the pathogenesis of human Th17 cells and adds clinical relevance to this question by analyzing in parallel HD and eRA patients. The results presented here indicate that Th17 cells from eRA patients are prone to expand to a pathological cell population, under Th17 polarizing conditions in the presence of TGF β , and that VIP prevents their pathogenesis in both eRA patients and HD. Further characterization of the mechanism underlying the conversion and function of plastic Th17 cells to a non-pathogenic phenotype will provide new insights into the development of new therapeutic strategies for RA.

AUTHORSHIP

Y.J., R.J., J.L. AND R.P.G. designed and performed the experiments. R.J., M.G. and C.M., acquisition the data. R.J., Y.J., R.P.G., A.M.O., M.M. and M.G. analyzed the data. R.J., Y.J. and R.P.G. composed the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III [PI11/00195, PI12/00758 and RETICS RD08/0075, RD12/0009/0002] within VI PNDE I+D+I by FEDER funds from EU and S2010/BMD-2350 from CAM and by grants from the ISCIII to R.J. The authors are grateful to the patients of the eRA register from Hospital La Princesa and to the Transfusion Center of CAM for recruiting healthy donors. The authors are also grateful to Carmen Moreno for her collaboration.

DISCLOSURES

A patent application [P201230827] for the use of VIP as a prognostic marker in autoimmune diseases has been deposited by the Fundación de Investigación Biomédica of La Princesa hospital at the Oficina Española de Patentes y Marcas. The full name of the patent application is= VIP use as a prognostic marker of autoimmune diseases.

REFERENCES

1. Machold, K. P., Stamm, T. A., Nell, V. P., Plugbeil, S., Aletaha, D., Steiner, G., Uffmann, M., Smolen, J. S., (2007) Very recent onset rheumatoid arthritis= clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology [Oxford]* 46, 342-339.
2. Hickman-Brecks, C. L., Racz, J. L., Meyer, D. M., LaBranche, T. P., Allen, P. M. (2011) Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J. Autoimmun.* 36, 65-75.
3. van den Berg, W. B., Miossec, P. (2009) IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 549-553.
4. Kellner, H. (2013) Targeting interleukin-17 in patients with active rheumatoid arthritis= rationale and clinical potential. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 5, 141-152.
5. Leipe, J., Grunke, M., Dechant, C., Reindl, C., Kerzendorf, U., Schulze-koops, H., Skapenko, A. (2010) Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheu.* 62, 2876–2885.

6. Eggleton, P., Bremer, E., Tarr, J. M., de Bruyn, M., Helfrich, W., Kendall, A., Haigh, R. C., Viner, N. J., Winyard, P. G. (2011) Frequency of Th17 CD20+ cells in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients is higher compared to healthy subjects. *Arthritis Res. Ther.* 13, R208.
7. Kim, J., Kang, S., Kim, J., Kwon, G., Koo, S. (2013) Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Lab. Med.* 33, 52-59.
8. Benedetti, G., Miossec, P. (2013) Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 44, 339-347.
9. Yang, X. O., Pappu, B., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A. D., Schluns, K. S., Watowich, S. S., Tian, Q., Jetten, A. M., Dong, C. (2008) TH17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28, 29-39.
10. Sundrud, M. S., Trivigno, C. (2013) Identity crisis of Th17 cells= many forms, many functions, many questions. *Semin. Immunol.* 25, 263-272.
11. van Hamburg, J. P., Asmawidjaja, P. S., Davelaar, N., Mus, A. M., Colin, E. M., Hazes, J. M., Dolhain, R. J., Lubberts, E. (2011) Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblasts interaction, including autocrine interleukin-17A production. *Arthritis Rheum.* 63, 73-83.
12. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485-517.
13. Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F. J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleiweietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D. A., Sobel, R. A., Regev, A., Kuchroo, V. K. (2012) Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* 13, 991-999.
14. Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X. P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J. E., Ramos, H. L., Wei, L., Davidson, T. S., Bouladoux, N., Grainger, J. R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W. T., Sun, H. W., Eberl, G., Shevach, E. M., Belkaid, Y., Cua, D. J., Chen, W., O'Shea, J. J. (2010) Generation of pathogenic T_H17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 467, 967-971.
15. Haines, C. J., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Jain, R., Chang, C., Joyce-Shaikh, B., Porth, K., Boniface, K., Mattson, J., Basham, B., Anderton, S. M., McClanahan, T. K., Sadekova, S., Cua, D. J., McGeachy, M. J. (2013) Autoimmune memory T helper 17 cell function and expansion are dependent on interleukin-23. *Cell. Rep.* 3, 1378-1388.
16. Kleiweietfeld, M., Hafler, D. A. (2013) The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 25, 305-312.
17. Gomariz, R. P., Martinez, C., Abad, C., Leceta, J., Delgado, M. (2001) Immunology of VIP= a review and therapeutic perspectives. *Curr. Pharm. Des.* 7, 89-111.
18. Gomariz, R. P., Juarranz, Y., Abad, C., Arranz, A., Leceta, J., Martinez, C. (2006) VIP-PACAP system in immunity= new insights for multitarget therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1070, 51-74.
19. Dorsam, G. P., Benton, K., Failing, J., Batra, S. (2011) Vasoactive intestinal peptide signaling axis in human leukemia. *World. J. Biol. Chem.* 2, 146-160.
20. Delgado, M., Martinez, C., Johnson, M. C., Gomariz, R. P., Ganea, D. (1996) Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 [VIP-R1 and VIP-R2] mRNA in murine lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 68, 27-38.
21. Leceta, J., Gomariz, R. P., Martinez, C., Carrión, M., Arranz, A., Juarranz, Y. (2007) Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 14, 134-138.
22. Jimeno, R., Leceta, J., Martínez, C., Gutiérrez-Cañas, I., Pérez-García, S., Carrión, M., Gomariz, R. P., Juarranz, Y. (2012) Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells. *Immunol. Cell. Biol.* 90, 178-186.
23. Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., Gomariz, R. P. (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat. Med.* 7, 563-568.
24. Juarranz, Y., Abad, C., Martinez, C., Arranz, A., Gutiérrez-Cañas, I., Rosignoli, F., Gomariz, R. P., Leceta, J. (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7, R1034-R1045.
25. Carrión, M., Pérez-García, S., Jimeno, R., Juarranz, Y., González-Álvarez, I., Pablos, J. L., Gutiérrez-Cañas, I., Gomariz, R. P. (2013) Inflammatory mediators alter IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblast. *Immunomodulation by VIP. Neuroimmunomodulation* 20, 274-284.
26. Gutiérrez-Cañas, I., Juarranz, Y., Santiago, B., Martínez, C., Gomariz, R. P., Pablos, J. L., Leceta, J. (2008) Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets= implications for rheumatoid arthritis. *Brain. Behav. Immun.* 22, 312-317.
27. Juarranz, Y., Gutiérrez-Cañas, I., Santiago, B., Carrión, M., Pablos, J. L., Gomariz, R. P. (2008) Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 58, 1086-1095.
28. Juarranz, M. G., Santiago, B., Torroba, M., Gutiérrez-Cañas, I., Palao, G., Galindo, M., Abad, C., Martinez, C., Leceta, J., Pablos, J. L., Gomariz, R. P. (2004) Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology [Oxford]* 43, 416-422.
29. Martínez, C., Ortiz, A. M., Juarranz, Y., Lamana, A., Seoane, I. V., Leceta, J., García-Vicuña, R., Gomariz, R. P., González-Álvarez, I. (2014) Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One* 9, e85248.
30. Miossec, P., Kolls, J. K. (2012) Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11, 763-776.
31. Patel, D. D., Lee, D. M., Kolbinger, F., Antoni, C. (2013) Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 72, ii116-ii123.
32. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O. 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Byrker, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T. K., Laing, T., Mease, P., Ménard, H. A., Moreland, L. W., Naden, R. L., Pincus, T., Smolen, J. S., Stanislawski-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P. P., Upchurch, K. S., Vencovský, J., Wolfe, F., Hawker, G. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria= an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62, 2569-2581.
33. Jimeno, R., Leceta, J., Martínez, C., Gutiérrez-Cañas, I., Carrión, M., Pérez-García, S., Garín, M., Mellado, M., Gomariz, R. P., Juarranz, Y. (2014) Vasoactive Intestinal Peptide maintains the non-pathogenic profile of human Th17-polarized cells. *J. Mol. Neurosci.* DOI=10.1007/S12031-014-0318-3.
34. Lubberts, E., Koenders, M. I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C. J., Joosten, L. A., van den Berg, W. B. (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint

- inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 50, 650-659.
35. Omoyinmi, E., Hamaoui, R., Pesenacker, A., Nistala, K., Moncrieffe, H., Ursu, S., Wedderburn, L. R., Woo, P. (2012) Th1 and Th17 cell subpopulations are enriched in the peripheral blood of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology [Oxford]* 51, 1881-1886.
 36. McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurance, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., McClanahan, T. K., O'Shea, J. J., Cua, D. J. (2009) The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10, 314-324.
 37. Lee, Y. K., Turner, H., Maynard, C. L., Oliver, J. R., Chen, D., Elson, C. O., Weaver, C. T. (2009) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30, 92-107.
 38. Bending, D., De la Peña, H., Veldhoen, M., Phillips, J. M., Uytendhoeve, C., Stockinger, B., Cooke, A. (2009) Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J. Clin. Invest.* 119, 565-572.
 39. Mukasa, R., Balasubramani, A., Lee, Y. K., Whitley, S. K., Weaver, B. T., Shibata, Y., Crawford, G. E., Hatton, R. D., Weaver, C. T. (2010) Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. *Immunity* 32, 616-627.
 40. Gocke, A. R., Cravens, P. D., Ben, L. H., Hussain, R. Z., Northrop, S. C., Racke, M. K., Lovett-Racke, A. E. (2007) T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J. Immunol.* 178, 1341-1348.
 41. Hirota, K., Duarte, J. H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D. J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., Garefalaki, A., Potocnik, A. J., Stockinger, B. (2011) Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 12, 255-263.
 42. Esensten, J. H., Lee, M. R., Glimcher, L. H., Bluestone, J. A. (2009) T-bet-deficient NOD mice are protected from diabetes due to defects in both T cell and innate immune system function. *J. Immunol.* 183, 75-82.
 43. Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodoma, T., Tanaka, S., Bluestone, J. A., Takayanagi, H. (2014) Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into Th17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* 20, 62-68.
 44. Monte, K., Wilson, C., Shih, F. F. (2008) Increased number and function of FoxP3 regulatory T cells during experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 3730-3741.
 45. Abad, C., Gomariz, R., Waschek, J., Leceta, J., Marínez, C., Juarranz, Y., Arranz, A. (2012) VIP in inflammatory bowel disease= state of the art. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets.* 12, 316-322.
 46. Jimeno, R., Gomariz, R. P., Gutiérrez-Cañas, I., Martínez, C., Juarranz, Y., Leceta, J. (2010) New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol. Cell. Biol.* 88, 734-745.
 47. Yadav, M., Rosenbaum, J., Goetzl, E. J. (2008) Cutting edge= vasoactive intestinal peptide [VIP] induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J. Immunol.* 180, 2772-2776.
 48. Lara-Marquez, M., O'Dorisio, M., O'Dorisio, T., Shah, M., Karacay, B. (2001) Selective Gene Expression and Activation-Dependent Regulation of Vasoactive Intestinal Peptide Receptor Type 1 and Type 2 in Human T Cells. *J. Immunol.* 166, 2522-2530.
 49. Vomhof-DeKrey, E. E., Hermann, R. J., Palmer, M. F., Benton, K. D., Sandy, A. R., Dorsam, S. T., Dorsam, G. P. (2008) TCR signaling and environment affect vasoactive intestinal peptide receptor-1 [VPAC-1] expression in primary mouse CD4 T cells. *Brain Behav. Immun.* 22, 1032-1040.
 50. Delgado, M., Robledo, G., Rueda, B., Varela, N., O'Valle, F., Hernández-Cortés, P., Caro, M., Orozco, G., Gonzalez-Rey, E., Martin, J. (2008) Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 110-119.

KEY WORDS:

Rheumatoid arthritis · Vasoactive intestinal peptide · Th17 · VPAC receptors

Artículo 5

New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes.

Rebeca Jimeno, Rosa P Gomariz, Irene Gutiérrez-Cañas, Carmen Martínez, Yasmina Juarranz, Javier Leceta.

Immunology and Cell Biology, 2010, 88(7): 734-45.

ORIGINAL ARTICLE

New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes

Rebeca Jimeno¹, Rosa P Gomariz¹, Irene Gutiérrez-Cañas¹, Carmen Martínez², Yasmina Juarranz^{1,3} and Javier Leceta^{1,3}

Type I diabetes is an autoimmune T-cell-mediated disease associated with overexpression of inflammatory mediators and the disturbance of different T-cell subsets. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a potent anti-inflammatory agent with regulatory effects on activated T cells. As the equilibrium between different T-cell subsets is involved in the final outcome, leading to tolerance or autoimmunity, we studied the evolution of markers for T cells in nonobese diabetic (NOD) mice. The study of different transcription factors, cytokines or cytokine receptors, shows that VIP interferes with functional phase of T helper 17 (Th17) cells and prevents the increase in the proportion of Th1 to Th17 cells. On the other hand, VIP-treated NOD mice show an increase in the proportion of CD4⁺CD25⁺ cells in the spleen. Thus, VIP switches the Tregs/Th17 ratio leading to tolerance in NOD mice. Similarly, VIP reverses the ratio of Th1-/Th2-cell subsets associated with autoimmune pathology. All these effects on the ratio of T-cell subsets and the anti-inflammatory effect of VIP in decreasing proinflammatory mediators result in a reduction of β -cell destruction in pancreas. Taken together, these results show that VIP provides significant protection against spontaneous diabetes by modulating T-cell subsets and counterbalancing tolerance and immunity.

Immunology and Cell Biology advance online publication, 23 March 2010; doi:10.1038/icb.2010.29

Keywords: vasoactive intestinal peptide; NOD mice; type I diabetes; Th17; T-cell subsets; regulatory T cell

Human type I diabetes (T1D) is an autoimmune disease that results from the destruction of pancreatic insulin-producing β -cells.^{1,2} The autoimmune response is believed to be due to a breakdown of immunological tolerance, resulting in a lack of immunoregulation of autoreactive diabetogenic T cells. The nonobese diabetic (NOD) mouse is a strain that is genetically prone to develop different, organ-specific, autoimmune diseases. It has been a very useful model for studying the mechanisms involved in the initiation and propagation of T1D.³ In NOD mice, islet antigens first appear in the pancreatic lymph nodes at around 2–4 weeks of age; autoreactive effectors T cells are sensitized and then infiltrate the islets.⁴ Progression to overt disease occurs in 80% of female mice between 10 and 30 weeks and it results from T-cell-mediated islet destruction.

T helper (Th) cells have been classified into different functional subsets, each characterized by its specific cytokine pattern and effector function.⁵ The Th1 subset is thought to be a crucial player in most organ-specific autoimmunity, including T1D, in which type I cytokines (interferon- γ (IFN γ), interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- α (TNF α)) predominate over type II (Th2) and regulatory (Tregs) cytokines (IL-4 and IL-10). Two important classes of Tregs

within the CD4⁺ T-cell subset are CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs and T-regulatory type I (Tr1) cells, that differ in a number of biological features. There are two major categories of CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs, the naturally occurring CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs from the thymus (nTregs) and the induced CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs produced in the periphery (iTregs).⁶ Type I cytokines initiate a cascade of inflammatory processes in the islets, inducing the production of inflammatory cytokines and both oxygen- and nitrogen-free radicals that are toxic to β -cells.⁷ Available data suggest that Th1 has a major role in diabetes, driving the development of disease through IFN γ .⁸ Conversely, other studies indicate a protective role for IFN γ .⁸ However, a new subset, the Th17 cells, is believed to orchestrate inflammation and immunity in organ-specific autoimmune diseases.^{9,10} It has recently been found that progression from insulinitis to diabetes correlates with the expression of IL-17 in the pancreas,¹¹ suggesting that Th17 cells have a pathological role in the development of T1D.⁸ This subset is dependent on IL-23 for survival and produces IL-17, IL-21 and IL-22. Its differentiation, however, is directed by IL-6, a proinflammatory cytokine, and transforming growth factor- β (TGF β), a regulatory cytokine. As TGF β is a key regulator for the differentiation of iTregs,

¹Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain and ²Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Professor Y Juarranz, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain.

E-mail: yashina@bio.ucm.es

Received 8 September 2009; revised 10 February 2010; accepted 11 February 2010

one may hypothesize that the ratio between inflammatory and regulatory cytokines affects the final outcome of tolerance or autoimmunity.^{9,12} Inefficient mechanisms of peripheral tolerance have been claimed to contribute to unbalancing the equilibrium between pathogenic and protective T cells, associated with the transition from the pre-diabetic to the diabetic phase. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, acting by distinct mechanisms, prevent the activation of potentially autoreactive effector T cells.⁶ CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells may control self-tolerance in NOD mice during the pre-diabetic phase, but their proportion and functional capacity has been shown to be reduced during diabetes development. The progression to irreversible β -cell destruction could be due to the progressive decline in the number and/or the functional capacities of Tregs cells or to the progressive resistance of effector mechanisms to immunoregulation.¹³

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a 28 aminoacid neuropeptide first isolated by Said and Mutt¹⁴ that belongs to the secretin family. Its action is mediated by three heterotrimeric G-protein-coupled receptors that also interact with pituitary adenylate cyclase-activating peptide, a peptide of the same family which is 68% identical.^{15,16} Although VIP is widely distributed in the central and peripheral nervous systems, it has subsequently been found to be produced by different endocrine and immune cells.^{17–19} It is capable of eliciting a broad spectrum of biological actions, being a potent neuroendocrine mediator of physiological responses that influence the development of endocrine pancreas and insulin release.^{20–22} Moreover, VIP is one of the best-studied immunoregulatory neuropeptides. These studies revealed that VIP can modulate both innate and adaptive immunity, showing a predominantly anti-inflammatory action. It decreases the Th1/Th2 cytokine ratio and promotes T regulatory functions.^{17–19,23} An increasing body of *in vivo* data indicates that administration of VIP or pituitary adenylate cyclase-activating peptide may have promising outcomes in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, in particular Th1-associated pathologies such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome and Crohn's disease.^{24–28} It has recently been described that VIP regulates both *in vivo* Th17 and IL-17 production in autoimmunity,^{29,30} and *in vitro* Th17 differentiation.^{31,32} Previous reports indicate that VIP also prevents diabetes development in NOD mice.^{33,34} The protective mechanism is associated with reduced circulating levels of Th1 cytokines, increased levels of IL-10 and upregulation of markers for regulatory T cells.^{27,33,35}

As the equilibrium between different T-cell subsets is involved in the final outcome leading to tolerance or autoimmunity, the aim of the present work is to examine the evolution of T-cell marker functions during the development of autoimmune diabetes and the effect of VIP treatment, showing a time-course study of its effect on molecular and immunological mechanisms and analyzing the ratio of Th17/Tregs, Th17/Th1 or Th2/Th1 cells.

RESULTS

VIP delays onset and insulinitis of autoimmune diabetes in mice

First evidence of diabetes appeared in vehicle-treated mice at 16–18 weeks of age, the incidence increasing gradually to 70% diabetic mice at 30 weeks. Vehicle-injected mice presented infiltration in 80% of the pancreatic islets, even in pre-diabetic states, at 10 weeks of age, with evidence of islet destruction affecting 60% of the islets during overt diabetes (Figures 1a and b). Islet infiltration in NOD mice treated with VIP was negligible at 10 weeks (lesser 10%) and progressed slowly, leaving 50% of islets intact at 30 weeks. Even in the infiltrated islets, the accumulation of inflammatory cells was restricted to the periphery

(Figures 1a and b). We also analyzed two important mediators of inflammation in pancreas from nontreated and VIP-treated NOD mice by real-time PCR. TNF α is a principal proinflammatory cytokine that mediates apoptosis in pancreas acinar cells^{36,37} and it has previously been shown that VIP inhibits this TNF α effect in acinar cells from NOD mouse submandibular glands.³⁶ On the other hand, inducible nitric oxide synthase (iNOS)/nitric oxide have been implicated in the pathogenesis of this autoimmune disease, as well as in inflammatory conditions and apoptosis of β -cells in pancreas.^{38,39} VIP is able to decrease local mRNA expression of iNOS in other animal models of autoimmune disease, such as rheumatoid arthritis.²⁹ Figure 1c shows that mRNA expression of both proinflammatory mediators increased with the evolution of the disease in nontreated NOD mice. VIP treatment decreased the mRNA expression of TNF α and iNOS significantly in pancreas of NOD mice. With these results, we confirm the anti-inflammatory role of VIP during autoimmune diabetes.

VIP delays onset of autoimmune diabetes in NOD-severe combined immunodeficiency mice during cell transfer experiments

To evaluate whether splenocytes from VIP-treated mice suppress the diabetogenic potential of diabetic splenocytes, we transferred spleen cells from diabetic NOD mice into female NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice recipients, alone or cotransferred with spleen cells from age-matched VIP-treated mice (Figure 2a). Blood glucose levels in mice that only received cells from diabetic animals began to rise 3 weeks after transfer and were close to 600 mg per 100 ml at 4 weeks (Figure 2b). At 5 weeks after transfer, 100% of NOD-SCID mice that had only received cells from NOD mice died. NOD-SCID mice coprovided with cells of VIP-treated mice showed a higher viability, 100% of them being viable after 5 weeks. Increased blood glucose levels were also delayed by 2 weeks and developed more slowly. These results indicate that splenocytes from VIP-treated animals are able to delay the onset of diabetes transfer induced by cells from NOD mice, which is symptomatic of T-cell tolerance, by 15 days.

The VIP effect on the stabilization and functionality of Th17 cell subset in NOD mice

Previous reports using a collagen-induced mouse model of arthritis have shown that VIP treatment resulted in the suppression of IL-17 and IL-23, cytokines produced by Th17 cells.^{33,34} To investigate the *in vivo* VIP effect on Th17 cells more deeply, we checked the mRNA expression of different cytokines related to the functionality (Figure 3a) and stabilization (Figure 3b) of Th17 cell subset.^{9,40} NOD female mice received 2.5 nmol of VIP intraperitoneally every other day from 4 to 30 weeks of age, and pancreas mRNA expression was evaluated by quantitative real-time PCR. The profile of IL-17, IL-17R, IL-22, IL-23p19, IL-12p40, IL-23R and IL-12R β 1 was studied during the development of diabetes, from 10 to 25 weeks of age (Figure 3). IL-17, IL-23p19, IL-12p40 and IL-22 profiles of mRNA expression were very similar in NOD mice, all of which showed a peak in pancreas expression between 15 and 20 weeks of age. Treatment with VIP significantly decreased the mRNA expression of IL-17 at 25 weeks and of IL-22 at 20 weeks. IL-17 and IL-23 receptors showed a comparable profile to their ligands in NOD mice. However, no significant differences were observed in mRNA expression of the different receptors tested after VIP treatment. These results suggest that VIP decreases IL-17 and IL-22 expression in the pancreas of NOD mice at the end of diabetes evolution, which is likely to interfere with the functionality of Th17 cells.

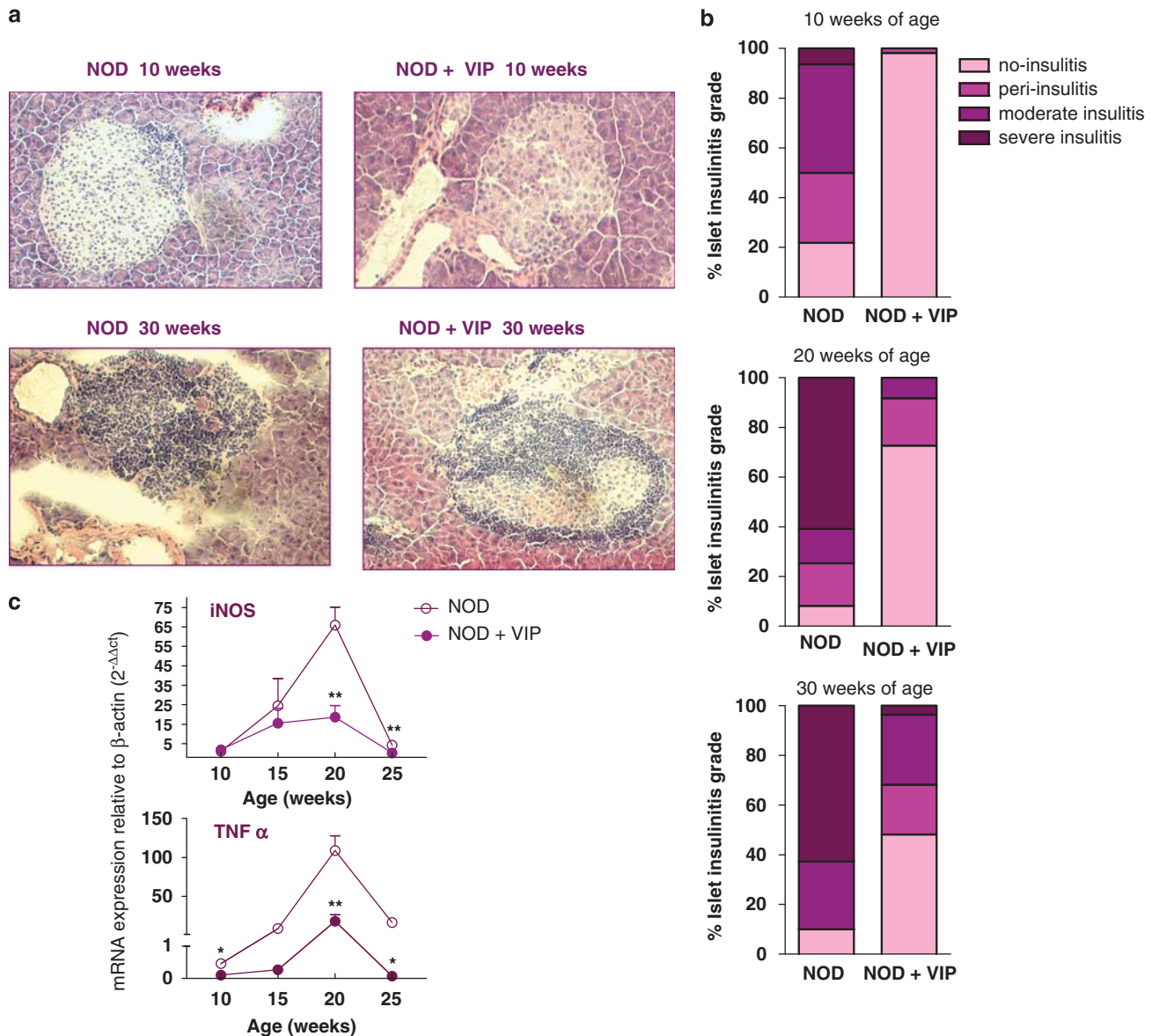


Figure 1 VIP delays onset and insulinitis of autoimmune diabetes in mice. (a) Histological pancreatic sections marked with Gomori stain of nontreated and VIP-treated NOD mice at 10 or 30 weeks of age. A representative experiment is shown. (b) Scoring of histological grade of insulinitis was performed on pancreatic sections marked with Gomori stain. Islets were scored for no-insulinitis, peri-insulinitis, moderate insulinitis and severe insulinitis (see Methods). (c) mRNA expression of iNOS and TNF α was determined by real-time PCR at 10, 15, 20 and 25 weeks of age in pancreas and spleen from NOD and VIP-treated NOD mice. Values for the relative expression of each gene were determined as indicated under Methods. Data are means \pm s.e. of six mice per parameter checked, differences between untreated and VIP-treated NOD mice for each parameter studied were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

VIP shifts the Th17/Th1 ratio in NOD mice

In NOD mice, a generalized intrinsic T-cell defect results in a deregulated cytokine effector function. The increase in circulating levels of Th1 cytokines, as well as an enhanced accumulation of Th1 cells in the pancreas, are markers of the progression of diabetes.⁷ However, increasing evidence points to the role of Th17 cells in the development of NOD mice, although Th17 cells transferred into NOD mice have shown to acquire a Th1-pathogenic phenotype.^{41,42} There are no current studies related to the Th17/Th1 ratio in NOD mice; therefore, we considered the profile of this ratio during diabetes development and the effect of VIP treatment. The ratio between the expression of the transcription factors that commit to Th17 (ROR γ t)

and Th1 (T-bet, encoded by Tbx21) cell lineages in both pancreas and spleen was determined. In general, this ratio decreased in pancreas and spleen from NOD mice with the onset of the diabetes (Figure 4). Treatment with VIP increased it in both tissues. IL-12 is the differentiation factor for Th1 cells and it is comprised of IL-12p35 and IL-12p40 subunits. It shares the latter with IL-23 cytokine, the stabilization factor for Th17 cells. In this respect, the IL-23p19/IL-12p35 mRNA ratio indicates the prevalence of Th1 or Th17 differentiation factors. This ratio decreased with age in NOD mice pancreas and the treatment with VIP increased it (Figure 4a). IL-23R, the specific receptor for IL-23, is comprised of IL-23R and IL-12R β 1 subunits. The specific receptor for IL-12 is formed by IL-12R β 1 and

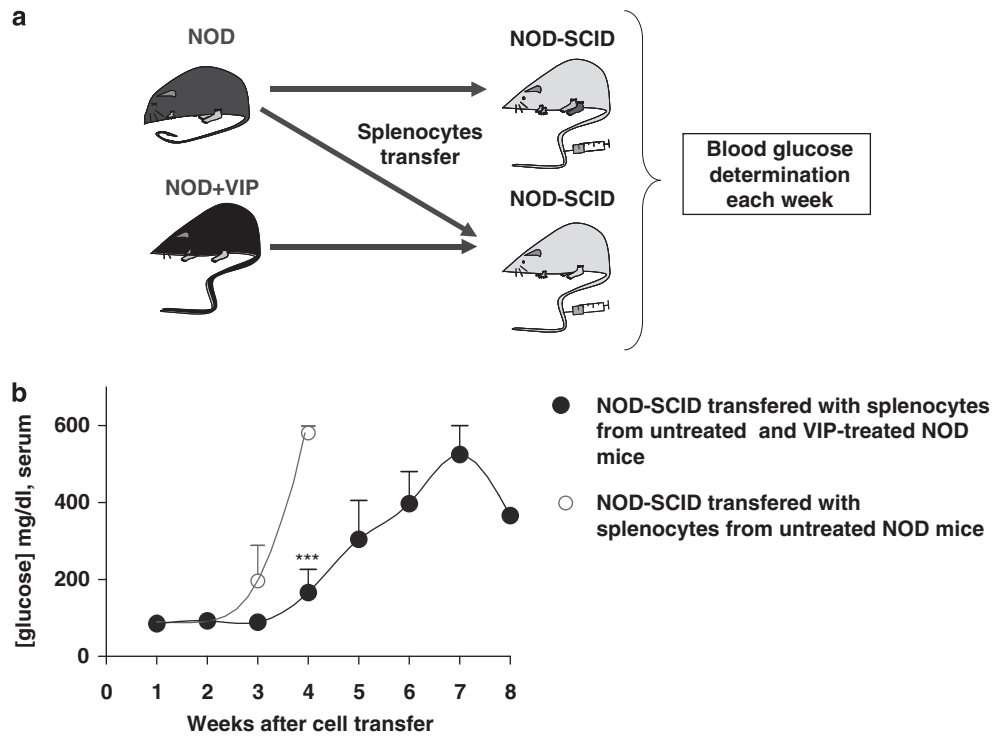


Figure 2 VIP delays onset of autoimmune diabetes in NOD-SCID mice during cell transfer experiments. (a) Cell transfer scheme. Two different groups of NOD-SCID mice were transferred, the first with splenocytes from NOD mice (20 weeks) and the second with the same cells plus splenocytes from VIP-treated NOD mice (20 weeks). (b) Circulating levels of glucose in the animals after cell transfer. Data are means \pm s.e. of two experiments with five animals per group. Differences between NOD-SCID mice that only received cells transferred from NOD mice and NOD-SCID mice that received cells transferred from NOD mice plus VIP-treated NOD mice were statistically significant; *** $P < 0.001$.

IL-12R β 2 subunits; hence, IL-23R/IL-12R β 2 ratio indicates the proportion of cells sensitive to Th1 or Th17 differentiation. VIP was also able to significantly increase the mRNA IL-23R/IL-12R β 2 ratio in pancreas from NOD mice (Figure 4a). The ratio between IL-17 and IFN γ , the signature cytokines for Th17 and Th1, respectively, significantly switched in the spleen of VIP-treated NOD mice at 15 weeks of age (Figure 4b). In summary, NOD mice show declining values of this ratio with the progression of the disease that could be due to an increase of the Th1 cell subset or a decrease of the Th17 cell subset as the disease develops. Treatment with VIP reverts this ratio, increasing Th17 cells relative to the Th1-cell subset.

VIP modulates the presence of CD4⁺CD25⁺ T cells in the spleens of NOD mice

CD4⁺CD25⁺ Tregs cells are a significant regulatory subset involved in control of diabetes in NOD mice.^{43,44} Previous results indicate that VIP restores tolerance to pancreatic islets from NOD mice by promoting the local differentiation and function of Tregs.³³ However, there are no data related to VIP effect at systemic level in this model. We therefore studied the effect of VIP treatment on the evolution of this cell population in the spleen by flow cytometry. Figure 5 shows that the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells progressively decreased as the disease progressed. However, in mice treated with VIP, the percentage of this cell population was significantly higher than in nontreated mice between 20 and 30 weeks of age. These results confirm that VIP modulates CD4⁺CD25⁺ T cells development and function, and may override the breakdown of self-tolerance during autoimmune diabetes in mice.

VIP shifts the Tregs/Th17 ratio in NOD mice

To study whether the protective effect of VIP on diabetes outcome in NOD mice³³ involves a switch of this ratio, we studied the evolution of several markers related to these T-cell subsets in VIP-treated and nontreated NOD mice. Pancreas and spleen mRNA was tested at different weeks of age by quantitative real-time PCR for Foxp3, TGF β , IL-10 or IL-27p28 as markers for Tregs, and ROR γ t, IL-6, IL-17 and IL-23p19 as markers for Th17 cells. The ratio between the expression of the transcription factor that corresponds to Tregs (Foxp3) and Th17 (ROR γ t) cell lineages in both pancreas and spleen was determined (Figure 6). At local level, in pancreas, the treatment with VIP significantly augmented the Foxp3/ROR γ t ratio at 10, 15 and 25 weeks of age, whereas it decreased at 20 weeks of age. Treatment with VIP in spleen also showed an increase in this ratio at 25 weeks of age. Two cytokines with opposing effects, TGF β and IL-6, cooperate to induce the differentiation of Th17 cells. However, TGF β alone drives the conversion of naïve T cells into Foxp3⁺ Tregs. We therefore also checked the ratio between TGF β and IL-6. VIP treatment also notably increased the TGF β /IL-6 ratio in pancreas at 10, 15 and 25 weeks (Figure 6a). Two other cytokines involved in the Tregs-Th17 dichotomy, IL-10 and IL-17, were also analyzed by the means of their mRNA expressions in pancreas and spleen. VIP increased IL-10 expression versus IL-17 at 20 and 25 weeks of age in pancreas (Figure 6a), whereas there were no significant differences in spleen (Figure 6b). IL-23, comprised of IL-12p40 plus IL-23p19 subunits, is the stabilization factor for Th17 cells. IL-27, comprised of IL-12p40 plus IL-27p28, inhibits Th17 response or, together with TGF β , might be the differentiation factor for IL-10-producing

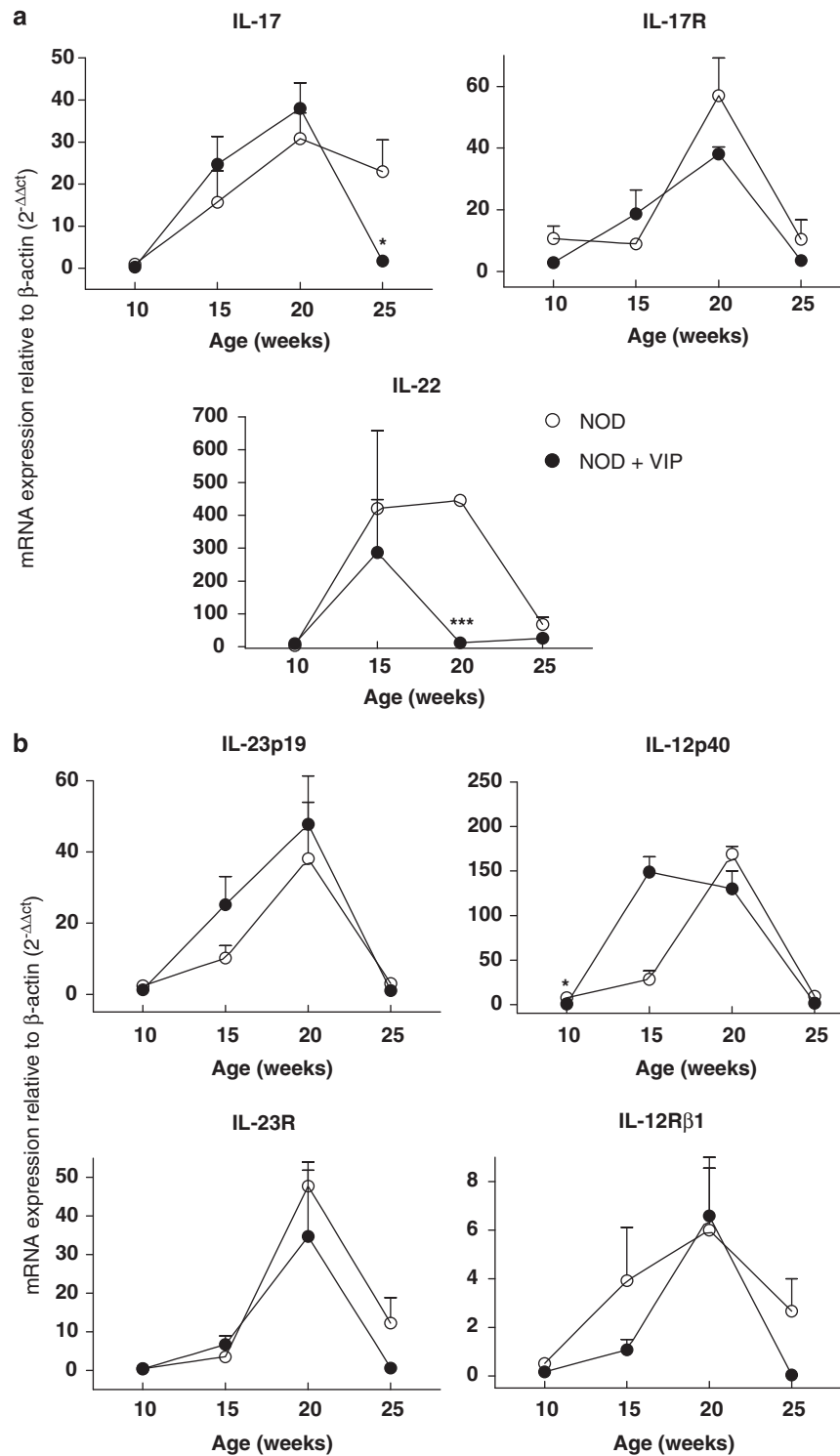


Figure 3 VIP effect on the stabilization and functionality of Th17 cell subset. Pancreas mRNA expression of cytokines and cytokine receptors of both functional (a) and stabilization phases of Th17 (b) was measured by quantitative real-time PCR. Values for the relative expression of each gene were determined as indicated under Methods. Data are means \pm s.e. of six mice per parameter checked, differences between untreated and VIP-treated NOD mice for each parameter studied were statistically significant; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

T cells, Tr1.^{9,45,46} We thus studied the evolution of the IL-27p28/IL-23p19 ratio during the onset of diabetes in NOD mice. Results showed a decreased ratio between 15 and 20 weeks of age, which was increased at 10 and 25 weeks (Figure 6a). The treatment

with VIP only increased this ratio significantly at 10 weeks of age (Figure 6a). All these results indicate that VIP reverses the ratio between Tregs/Th17 cell subsets, leading to tolerance in NOD mice.

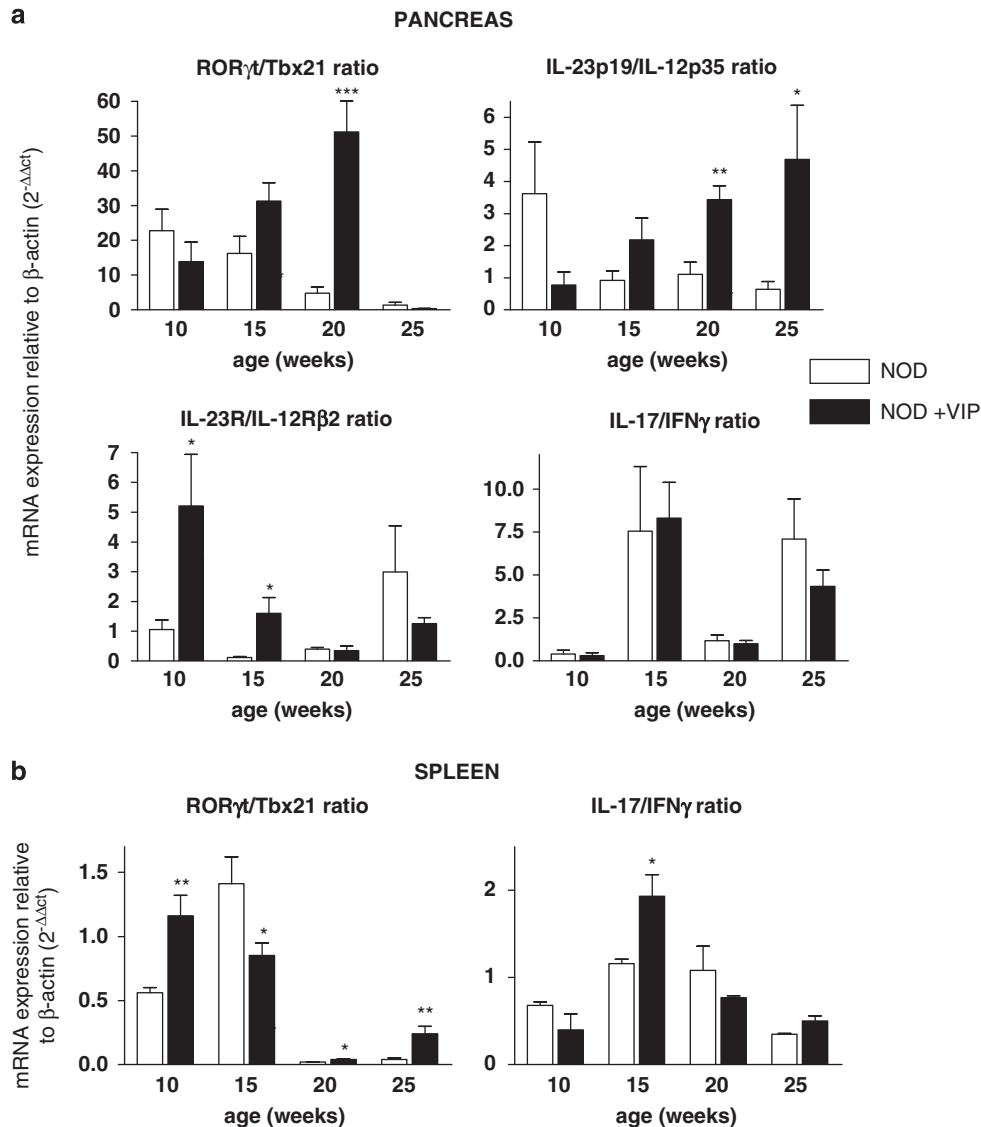


Figure 4 VIP effect on the Th17/Th1 ratio in NOD mice. mRNA expression of Tbx21, RORγt, IL-23p19, IL-12p35, IL-23R, IL-12Rβ2, IL-17 and IFNγ was determined by real-time PCR at 10, 15, 20 and 25 weeks of age in pancreas (a) and spleen (b) from NOD and VIP-treated NOD mice. Values for the relative expression of each gene were determined as indicated under Methods. The ratios between mRNA expression of RORγt/Tbx21, IL-23p19/IL-12p35, IL-23R/IL-12Rβ2 and IL-17/IFNγ are shown. Data are means ± s.e. of six mice per parameter checked, differences between untreated and VIP-treated NOD mice for each parameter studied were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

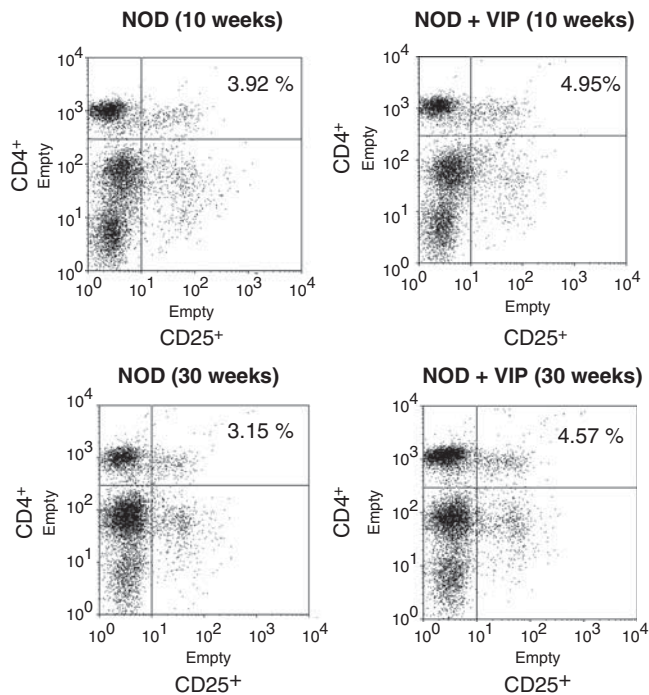
VIP modifies the Th1/Th2 ratio in NOD mice

Th2 cells are associated with a beneficial effect in NOD mice.⁴⁷ It has been generally shown that VIP increases Th2 and decreases Th1 cells in different animal models of autoimmune disease.^{17,18} In humans, VIP can differentially modify the functional capacity of human lymphocytes by inducing Th2 differentiation.⁴⁸ In addition, previous results have shown that VIP increased GATA-3 (the transcription factor for Th2 cells) and decreased Tbx21 mRNA expression in pancreas from NOD mice at 15 weeks.³³ To monitor the effect of VIP on the Th1/Th2 ratio during the evolution of diabetes in NOD mice, we tested the mRNA expression of Tbx21 and GATA-3 in pancreas and spleen from nontreated and VIP-treated NOD mice at 10, 15, 20 and 25 weeks. Pancreas and spleen Tbx21/GATA-3 ratios were significantly decreased in VIP-treated NOD mice at 10, 15 and 25 weeks of age, compared with nontreated NOD mice (Figure 7). This

means that NOD mice show an increased Th1 cell subset during the development of the autoimmune pathology. However, treatment with VIP reverses this ratio, increasing Th2 relative to Th1 cell subsets.

DISCUSSION

Type I diabetes is a chronic autoimmune disease, in which different phases can be recognized. During the induction and pre-diabetic stage, innate immune mechanisms contribute to the development of insulinitis, a self-amplification process ultimately leading to an adaptive immune response against pancreatic antigens.² During this process, islets are infiltrated and damaged in such a way that, by 20 weeks of age, 80% of islets show a high degree of destruction, coinciding with diabetes onset. The late stage of diabetes is characterized by stabilization of insulinitis. In this stage, there is no further destruction of islets and possibly some kind of resolution may occur, as proposed by some



% of CD4⁺CD25⁺ cells in spleen of non- and VIP-treated NOD mice

Figure 5 VIP modulates the presence of CD4⁺CD25⁺ T cells in the spleen of NOD mice. Flow cytometry analysis of splenic CD4⁺CD25⁺ cells was performed on spleen cell suspensions stained with PE-CD4 and FITC-CD25 monoclonal antibodies and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (above). The indicated proportion of double-positive cells was determined in the gated lymphocyte subpopulation based on forward and side-scatter parameters. A representative experiment is shown for 10 and 30 weeks of age (below). Data are means \pm s.e. of six mice per parameter checked, differences between untreated and VIP-treated NOD mice for each parameter studied were statistically significant; * $P < 0.05$.

authors who consider T1D as a relapsing–remitting disease.⁴⁹ On the other hand, in VIP-treated NOD mice insulinitis is always mild, develops slowly and by 30 weeks, 75% of islets show a well-preserved architecture. Different components of innate immunity contribute to the development of insulinitis, and its defective resolution contributes to progressive loss of β -cells. Inflammatory mediators, such as IL-1, TNF α and nitric oxide are toxic to β -cells and induce their apoptosis,⁵⁰ mediated, at least in part, by activation of the NF- κ B signaling pathway. These mediators are also responsible for the recruitment of cells participating in the adaptive immune reaction that amplifies and maintains the inflammatory response in this manner. However, under the influence of VIP, there is reduced sensitivity of cells to inflammatory stimuli that produce a reduced amount of chemokines, inflammatory cytokines and inflammatory mediators such as nitric oxide.^{28,35,51} This effect is related to the property of VIP to

downregulate the expression and signaling of different Toll-like receptors,^{23,52,53} receptors recognizing pattern-recognition motifs that participate in the induction of T1D.² These properties of VIP may be responsible for the low expression of TNF α and iNOS in the pancreas of treated NOD mice, which may explain the preservation of islet structure preventing diabetes onset.

In addition to the importance of these inflammatory mediators, different T cells have a critical role in the development of diabetes in NOD mice. For this reason, the present report describes the evolution of markers associated with the activity of different T-cell subsets and/or functions implicated in diabetes evolution in NOD mice.

T helper 1 autoreactive subsets that mediate delayed-type hypersensitivity reactions have been implicated in several autoimmune disorders, including T1D. This assumption is based on the predominant production of the Th1 cytokine IFN γ in the draining lymph node and target organs after appropriate immunization and the transfer of the disease by antigen-specific Th1 clones. Moreover, in relapsing–remitting diseases, a decrease in the level of IFN γ -producing cells was observed in the recovery phase of the disease. Moreover, genetic deficiency of IFN γ led to increased susceptibility in experimental autoimmune encephalomyelitis,⁵⁴ and IFN γ has been shown to have a protective role in joint damage during rheumatoid arthritis.⁵⁵ On the other hand, mice deficient in IL-12p35 show exacerbated diseases and IL-23p19 deficiency protects from developing experimental autoimmune encephalomyelitis.⁵⁶ However, IL-23-deficient mice show IFN γ -secreting Th1 cells infiltrating the nervous tissue after MOG immunization, but are protected from experimental autoimmune encephalomyelitis development.⁵⁷ These unexpected findings provide evidence against a critical pathogenic role for Th1 cells in autoimmunity and point to the importance of Th17 in certain autoimmune disorders. There are also studies that show that IL-17 is not absolutely required for autoimmune arthritis.⁵⁸ Studies performed in the NOD mouse model indicate that both Th1 and Th17 antigen-specific cells are diabetogenic.⁴²

Results presented here indicate that Th17 activity, as evidenced by the expression of ROR γ t, IL-17, IL-17R, IL-22, IL23p19 or IL-23R, gradually increases in the pancreas of NOD mice, peaking at the onset of diabetes (20 weeks) and then declining. On the other hand, Th1 activity, indicated by the expression of Tbx21, IL-12p35 and IL-12R β 2, also increases as diabetes develops and, although there is a reduction at the time of maximal incidence, their expression is still high. As a consequence, the Th17/Th1 ratio gradually decreases during development of diabetes, indicating a preponderance of the Th1 response. Although increasing evidence points to the role of Th17 cells in NOD mice,⁴¹ it seems that the conversion of this cell subset into Th1^{42,59} is more important. In VIP-treated mice, the Th17 evolution is similar, although at the time of maximal diabetes incidence, the expression of the reported factors is lower than in nontreated mice. Besides, the expression of the Th1 markers is significantly lower in VIP-treated mice. Our results from examining the ROR γ t/Tbx21, IL-23p19/IL-12p35 and IL-23R/IL-12R β 2 ratios, reveal that this process may be impaired by VIP treatment as this ratio in VIP-treated mice increases gradually, indicating a reduction in Th1 activity that could be protective. However, the ratio of the effector cytokines IL-17 and IFN γ is similar in both groups; hence, these observations indicate that other subsets with different functions may be the source of IFN γ .^{8,60}

Paradoxically, Th17 development is induced by factors that also differentiate T-regulatory cells. The latter cell type has been implicated in modulating immune tolerance. TGF β is required for maintaining the population of naturally occurring T-regulatory cells and also induces *de novo* generation of the so-called induced regulatory

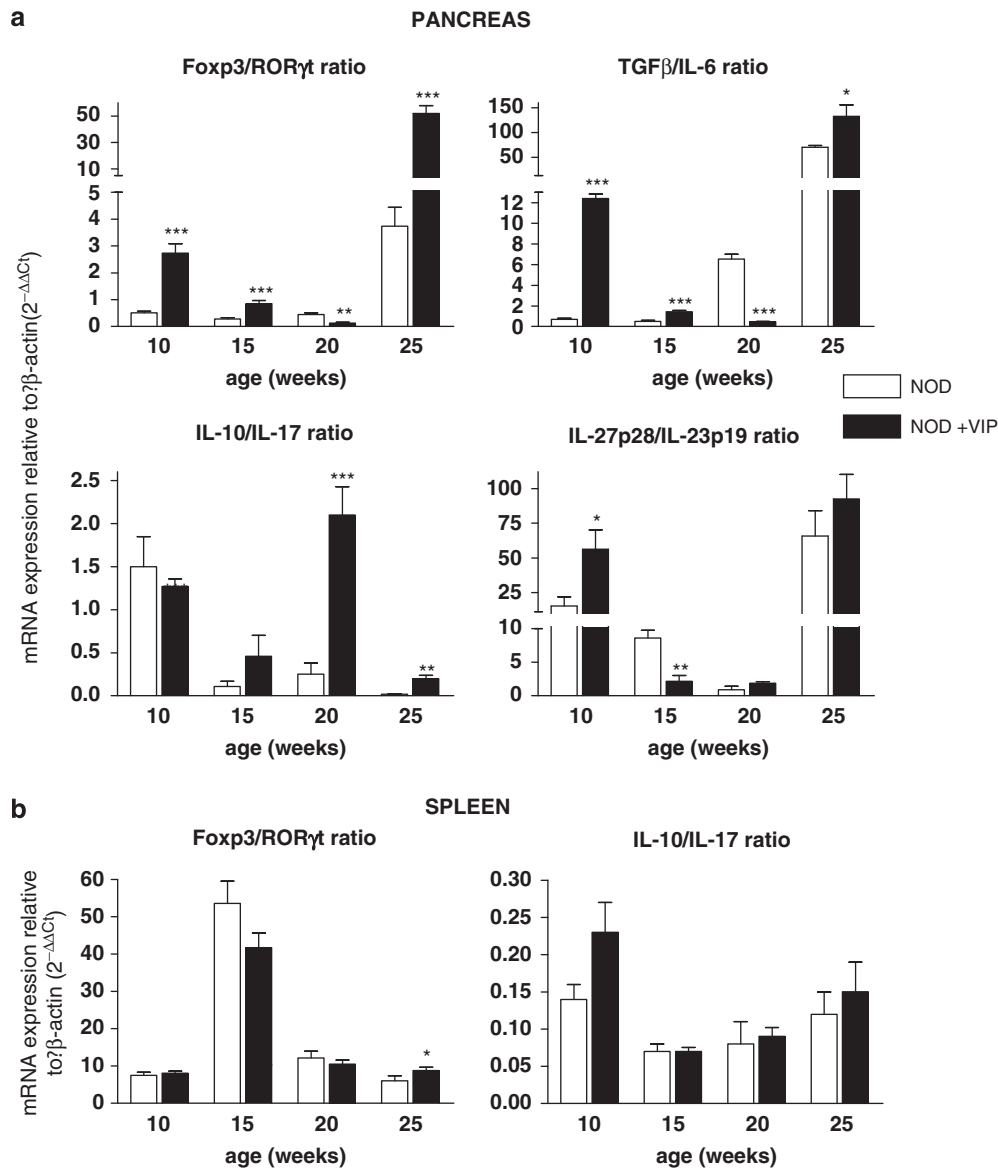


Figure 6 VIP shifts the Tregs/Th17 ratio in NOD mice. mRNA expression of Foxp3, RORγt, TGFβ, IL-6, IL-10, IL-17, IL-27p28, IL-23p19 was determined by real-time PCR at 10, 15, 20 and 25 weeks of age in pancreas (a) and spleen (b) from NOD and VIP-treated NOD mice. Values for the relative expression for each gene were determined as indicated under Methods. The ratios between mRNA expression of Foxp3/RORγt, TGFβ/IL-6, IL-10/IL-17 and IL-27p28/IL-23p19 are shown. Data are means ± s.e. of six mice per parameter checked, differences between untreated and VIP-treated NOD mice for each parameter studied were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

T cells. However, in the presence of IL-6 produced during inflammation, TGFβ generates Th17 cells, indicating a reciprocal relationship in the development of Th17 and Treg cells.¹² Several cell populations with immunoregulatory properties influence the progression of diabetes in NOD mice. In fact, their depletion or a deficiency in their number or activity is associated with more aggressive disease, whereas their transfer confers protective effects.⁶¹ Some authors have suggested primary defects in the number or function of Tregs in NOD mice, but these results have not been reproduced by other groups. Some discrepancy may arise from the use of different cell markers to identify Treg populations. Different T-cell subsets have been identified with regulatory function. nTregs and iTregs are characterized as CD4⁺CD25⁺ cells expressing the committing transcription factor Foxp3. Tr1 cells develop after antigen presentation in the presence

of IL-10 and only express CD25 and Foxp3 after activation.⁶² Its therapeutic importance stems from observations indicating that the development of similar cell subsets differentiates under tolerance induction for diabetogenic antigens and reverses ongoing diabetes, preventing epitope spreading and restoring normoglycemia.⁸ This cell subset is characterized by the high production of IL-10, but it also produces IFNγ.

The results observed indicate that Foxp3 and TGFβ expression in pancreas, as a marker of Tregs activity, rises gradually in untreated NOD mice. VIP treatment increased their expression at the onset of diabetes. The more obvious change observed in VIP-treated mice is the high expression of IL-10 at 20 weeks, when diabetes appeared in NOD mice, and at this point, there is no reduction of IFNγ production.

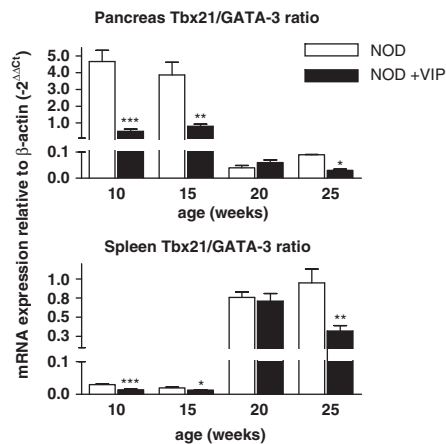


Figure 7 VIP changes Th1/Th2 ratio in NOD mice. mRNA expression of Tbx21 and GATA-3 was determined by real-time PCR at 10, 15, 20 and 25 weeks of age in pancreas and spleen from NOD and VIP-treated NOD mice. Values for the relative expression of each gene were determined as indicated under Methods. The ratios between mRNA expression of Tbx21/GATA-3 are shown (left). The individual mRNA expression values are shown (right). Data are means \pm s.e. of six mice per parameter checked, differences between untreated and VIP-treated NOD mice for each parameter studied were statistically significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Protection against diabetes development in NOD mice achieved by VIP may be mediated by the promotion of the development of Tregs. Other groups have found that the major mechanism by which VIP induces tolerance is through the generation of antigen-specific Tregs.⁶³ The data observed in cell transfer to NOD-SCID mice indicate the presence of cells that delay the onset of diabetes in VIP-treated mice. However, although the induced character of this cell population is a well-established fact, a better characterization needs to be achieved. Observations arising from the data presented here indicate that these cells may belong to the Tr1 subset. These regulatory cells present less stable Tregs markers.⁶⁴ Tr1 cells have been shown to differentiate on TCR stimulation in anti-inflammatory environments. In this context VIP, by their anti-inflammatory properties, may drive the differentiation of Tr1 cells.⁶³

As described above, there are reciprocal relationships between Treg and Th17 cells,^{9,10} and the ratio between these two T-cell subsets is important in determining the final outcome leading to tolerance or immunity. Foxp3/ROR γ t and TGF β /IL-6 ratios increased with the development of diabetes in NOD mice. Treatment of VIP increased these ratios at 10, 15 and 25 weeks of age. There is also a significant effect of VIP on the IL-10/IL-17 ratio at 20 weeks of age. IL-27 was initially shown to induce Tbx21 expression and to enhance Th1 responses, but it also has dominant anti-inflammatory properties.⁶⁵ It has also been identified as a differentiation factor for the generation of IL-10-producing Tr1 cells in the presence of TGF β .^{9,45,46} Treatment with VIP increased the IL-27p28/IL-23p19 ratio during the onset of diabetes in NOD mice, indicating that VIP may be involved in the generation of Tr1 cells.

Initial immunoregulatory strategies to treat T1D used immuno-suppressive agents, that were later followed by attempts to skew the immune response to self-antigens toward a nonaggressive Th2 response counteracting the inflammatory pathogenic Th1 response.⁶⁶ Th2 differentiation was the first-reported immunoregulatory property of VIP.⁶⁷ Accordingly, in the present report, the ratio between the expression of the specific transcription factors T-bet and GATA3 is skewed toward Th2 in the pancreas of VIP-treated mice. Although cytokine shift has been associated with disease protection and has been

Organs	Treatment	Age (weeks)	T-bet/Tbx21	GATA 3
Pancreas	NOD	10	0.14 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
	NOD+VIP	10	0.06 \pm 0.007 **	0.12 \pm 0.03 *
	NOD	15	0.31 \pm 0.06	0.08 \pm 0.03
	NOD+VIP	15	0.13 \pm 0.02 *	0.16 \pm 0.02 *
	NOD	20	4.94 \pm 1.19	127 \pm 29.8
	NOD+VIP	20	3.28 \pm 0.60	53 \pm 2.94 *
	NOD	25	4.19 \pm 0.55	45.9 \pm 4.18
	NOD+VIP	25	1.25 \pm 0.24 ***	43.6 \pm 4.66
Spleen	NOD	10	5.29 \pm 0.79	218 \pm 19.3
	NOD+VIP	10	4.12 \pm 0.58	290 \pm 29.7
	NOD	15	2.28 \pm 0.55	147 \pm 40.7
	NOD+VIP	15	3.75 \pm 0.42 *	274 \pm 54.3
	NOD	20	443 \pm 50.5	156 \pm 33.3
	NOD+VIP	20	339 \pm 48	119 \pm 4.97
	NOD	25	66.6 \pm 22.2	69.9 \pm 21.1
	NOD+VIP	25	10 \pm 2.50 *	31.3 \pm 4.93

ascribed to the Th1/Th2 ratio, this assumption may not be valid as some cytokines considered as markers for the subpopulations are produced by different cell types. In particular, IL-10 is produced by several T-cell subsets and also by macrophages and dendritic cells under certain stimuli. Dendritic cells are especially important in the differentiation of the effector cell type mediating the immune response. They also produce inflammatory mediators. *In vitro* studies have shown that dendritic cells differentiated in the presence of VIP-induced antigen-specific T cells with Tr1 phenotype.⁶³ In this respect, the effects of VIP on the innate immune system may be especially relevant for the evolution of autoimmune diseases, and particularly in T1D described here for the NOD mouse model.

In conclusion, although additional studies are needed to clarify the interrelation between T-cell subsets during the development of diabetes autoimmunity in NOD mice, our data show that VIP modulates inflammation as well as the Th17/Th1, Tregs/Th17 and Th1/Th2 ratios, providing significant protection against spontaneous diabetes and counterbalancing tolerance and immunity.

METHODS

Mouse and treatment protocol

Female NOD mice (NOD/NHS; Harlan, IN, USA) were injected intraperitoneally every other day from 4 to 30 weeks of age with 2.5 nmol of VIP (Neosystem, Strasbourg, France) in 200 μ l phosphate-buffered saline. Control animals received 200 μ l of phosphate-buffered saline alone. Blood glucose levels in tail venous blood were quantified once a week using Accutrend Sensor Complete (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A diagnosis of diabetes was made after two consecutive measurements higher than 240 mg per 100 ml. The experiments were performed according to rules accepted by the local ethics commission for investigations on live animals.

RNA extraction and quantitative real-time reverse transcriptase-PCR

A tissue tearer was used to homogenize pancreas or spleen tissue and total RNA was extracted with the Ultraspec RNA reagent, as recommended by the manufacturer (Biotecx, Houston, TX, USA). RNA was resuspended in diethylpyrocabonate water and quantitated at 260 or 280 nm. RNA (2 μ g) was used for reverse transcription. cDNA was obtained by SuperScript reverse

transcriptase (Invitrogen, Barcelona, Spain) or High Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 1). Then, cDNA was amplified by PCR analysis, using SYBR Green (Applied Biosystems)

Table 1 Reverse transcription methodology for each gene

Tissue	Reverse transcription methodology	Gene name
Pancreas	SuperScript reverse transcriptase	β -actin, Foxp3, GATA-3, ROR γ T, IL-6, TGF β , IL-10, IL-17, IL-17R, IL-23p19, IL-12p40, IL-27p28, IL-12p35, IL-23R, IL-12R β 1, IL-12R β 2, IFN γ , Tbx21, iNOS
	High-capacity cDNA reverse transcription	β -actin, TNF α , IL-12p40, IL-22
Spleen	High-capacity cDNA reverse transcription kit was used for all genes	

as a marker for DNA content. In brief, reactions were performed in 20 μ l, with 2 μ l cDNA, 10 μ l 2 \times SYBR Green PCR Master Mix, together with the 0.3 μ M primers. The sequences of primers used and the accession numbers of the analyzed genes are summarized in Table 2. Amplification was performed in an 7900 HT Fast Real-Time PCR Systems apparatus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) under the following conditions: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 1 min.

For relative quantification, we used a method that compares the amount of target normalized to an endogenous reference. The formula used was $2^{-\Delta\Delta C_t}$, representing the n-fold differential expression of a specific gene in a treated sample compared with the control sample, where C_t is the mean of the threshold cycle (the cycle at which the amplification of the PCR product is initially detected). ΔC_t was the difference in the C_t values for the target gene and the reference gene and β -actin (in each sample assayed), and $\Delta\Delta C_t$ represents the difference between the C_t from IL-12p40 gene expression of control Balb/c and each datum. Therefore, the final results do not correspond to particular quantitative measures, but to relative measures of each gene compared with the established common pattern, the IL-12p40 cytokine.

Table 2 Primer sequences for several factors connected with Th1, Th17 and Treg cells, as well as for β -actin (housekeeping gene)

Gene name	Genebank accession number	Sequence position	Primers	Sequence
β -actin	NM007393	694–831	β actin.for β actin.rev	5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3' 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'
Foxp3	AY357713	808–908	Foxp3.for Foxp3.rev	5'-GAAGCTGGGAGCTATGCAGG-3' 5'-TGGCTACGATGCAGCAAGAG-3'
GATA3	NM08091	124–224	GATA3.for GATA3.rev	5'-CTGACGGAAGAGGTGGACGT-3' 5'-GGATACCTCTGCACCGTAGCC-3'
IFN γ	K00083	929–1029	IFN γ for IFN γ .rev	5'-TGCTGATGGGAGGAGATGTCT-3' 5'-TTTCTTTTCAGGGACAGCCTGTT-3'
IL-6	NM031168	56–156	IL-6.for IL-6.rev	5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3' 5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'
IL-10	NM010548	113–218	IL-10.for IL-10.rev	5'-TGACTGGCATGAGGATCAGC-3' 5'-AGTCCGCAGCTCTAGGAGCA-3'
IL12p40	M86671	230–294	IL12p40.for IL12p40.rev	5'-CATGGAGTCATAGGCTCTGGAAA-3' 5'-TGGCCAGCATCTAGAACTCTTTG-3'
IL12p35	NM008351	216–316	IL12p35.for IL12p35.rev	5'-AGTTTGGCCAGGGTCATTCC-3' 5'-TCTCTGGCCGCTTCCACCAT-3'
IL23p19	NM031252	741–901	IL23p19.for IL23p19.rev	5'-ATCTATCAGCCAGACATCTACCAG-3' 5'-AAACAAGAACAGCACAAGTCTAATG-3'
IL27p28	NM145636	85–185	IL27p28.for IL27p28.rev	5'-TTCCCAACAGACCCCTGA-3' 5'-TGGACATAGCCCTGAACCTCA-3'
IL-17A	NM010552	338–398	IL-17A.for IL-17A.rev	5'-GAAGCTCAGTGCCGCCA 3' 5'-TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT-3'
IL17RA	NM008359	2830–2897	IL17RA.for IL17RA.rev	5'-GTGTAGTGCCCGCTTAGAAAT-3' 5'-CATCAAGTCTCAGTTCCCAAGTG-3'
IL23R	NM144548	2279–2310	IL23R.for IL23R.rev	5'-GTCACAAAGCCAAAGGACTAA-3' 5'-GGAAAACCAAGAGTTCCAGCCAT-3'
IL12R β 1	BC057212	2477–2592	IL12R β 1.for IL12R β 1.rev	5'-TGCAGCCTCGCTTGGTATC-3' 5'-GAGGCAAAATGAGCCTGTGACT-3'
IL12R β 2	NM008354	2652–2715	IL12R β 2.for IL12R β 2.rev	5'-CTTTCCATTTTGCATCAAGTTCTC-3' 5'-CTAGAGTCAGCCGCTCACCAC-3'
iNOS	NM010927	872–972	iNOS.for iNOS.rev	5'-AACAATGGCAACATCAGGTGC-3' 5'-CCAGCGTACCGGATGAGCT-3'
ROR γ T	NM011281	651–683	ROR γ T.for ROR γ T.rev	5'-GCCTCCTGCCACCTTGAGT-3' 5'-TCTGCCTCAGCTTTGCCTC-3'
Tbx21	NM009322	474–574	Tbx21.for Tbx21.rev	5'-CACTAAGCAAGGACGGCGAA-3' 5'-CCACCAAGACCACATCCACA-3'
TGF β	M13177	438–538	TGF β .for TGF β .rev	5'-GACTCTCCACCTGCAAGACCA-3' 5'-GGGACTGGCCGAGCCTTAGTT-3'
TNF α	NM013693	1456–1556	TNF α .for TNF α .rev	5'-CCTGTTCGGTCTCTTTTGC-3' 5'-AGTGATGTAGCGACAGCCTGG-3'

Previously, we performed a validation experiment comparing the standard curve of the reference and the target, to show that efficiencies were approximately equal.

Flow cytometry

Spleens were removed and gently minced in a stainless steel sieve. Cell suspensions were rendered free of red blood cells by exposure to a solution containing 0.83% NH_4Cl . The splenocytes were stained with a phycoerythrin-labeled anti-CD4 antibody and a fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD25 antibody (BD Bioscience, Pharmingen, San Diego, CA, USA). Incubation with the antibodies was performed at 4 °C for 30 min. Aliquots of splenocytes were incubated with a single fluorochrome-conjugated antibody and with isotype-matched control antibodies, to compensate for fluorescence emission overlap and nonspecific fluorescence, respectively. Cells were analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Histopathology

Pancreases were removed, embedded in Tissue-Tek OTC compound (Miles Laboratories Inc, Clifton, NJ, USA) and snap-frozen on liquid nitrogen; 8- μm cryostat sections were stained according to the Gomori–Bergman protocol (chromic-hematoxylin floxin). The incidence and severity of insulinitis was scored for at least 20 islets from each specimen by two independent, treatment-blind observers according to the following criteria: no lymphocytic infiltration (no-insulinitis); lymphocytic infiltrations surrounding islets and ducts, but no infiltration of the islet architecture (peri-insulinitis); lymphocytic infiltrations between 25 and 50% of the islet area (moderate insulinitis); lymphocytic infiltrations > 50% of the islet area and/or loss of islet architecture (severe insulinitis).

Transfer of diabetes to NOD-SCID mice

Spleen cells were obtained from 20-week-old female NOD mice or VIP-treated NOD mice by mechanical dissociation using a stainless steel screen and isolated by centrifugation on Histopaque gradients (Sigma, St Louis, MO, USA). Splenocytes from VIP-treated and nontreated NOD mice were pooled separately and transferred to 8-week-old NOD-SCID mice. Recipients were divided into two groups and cells were injected intravenously through the tail vein in 200 μl RPMI. One group received a cell suspension of 20×10^6 spleen cells of NOD mouse and a second group was cotransferred with 20×10^6 spleen cells from NOD mouse plus 20×10^6 spleen cells from VIP-treated NOD mouse. Blood glucose levels were determined once a week.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm s.e. of data obtained from at least four mice. Comparison between groups was made using the Student's *t*-test, Mann–Whitney *W*-test and ANOVA (analysis of variance) test.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants PI080025 from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), GR58/08 from UCM-BSCH and by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) to IGC and RJ. This work was partially supported by RETICS Program, RD08/0075 (RIER) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), within the VI PN de I+D+I 2008–2011.

- 7 Wang B, André I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C *et al*. Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13844–13849.
- 8 Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH *et al*. Innate IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Mol Med* 2008; **205**: 207–218.
- 9 Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Ann Rev Immunol* 2009; **27**: 485–517.
- 10 Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VJ. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nat Rev* 2008; **453**: 1051–1057.
- 11 Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ *et al*. Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mice. *Physiol Genomics* 2005; **21**: 201–211.
- 12 Awasthi A, Murugaiyan G, Kuchroo VK. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 660–670.
- 13 You S, Thiebemont N, Alyanakian MA, Bach JF, Chatenoud L. Transforming growth factor- β and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. *Immunological Rev* 2006; **212**: 185–202.
- 14 Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science* 1970; **169**: 1217–1218.
- 15 Laburthe M, Couvineau A, Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 2007; **28**: 1631–1639.
- 16 Langer I, Robberecht P. Molecular mechanisms involved in vasoactive intestinal peptide receptor activation and regulation: current knowledge, similarities to and differences from the A family of G-protein coupled receptors. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 724–728.
- 17 Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 2001; **7**: 89–111.
- 18 Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann NY Acad Sci* 2006; **1070**: 51–74.
- 19 Gonzalez-Rey E, Anderson P, Delgado M. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: a new approach for autoimmune therapy. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**: iii70–iii76.
- 20 Rachdi L, Marie JC, Scharfmann R. Role for VPAC $_2$ receptor-mediated signals in pancreas development. *Diabetes* 2003; **52**: 85–92.
- 21 Winzell MS, Ahren B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 2007; **28**: 1805–1813.
- 22 Ahren B. Role of Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the pancreatic endocrine system. *Ann NY Acad Sci* 2008; **1144**: 28–35.
- 23 Gomariz RP, Arranz A, Juarranz Y, Gutierrez-Cañas I, Garcia-Gomez M, Leceta J *et al*. Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity. *Peptides* 2007; **28**: 1825–1832.
- 24 Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L. Vasoactive intestinal peptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol* 2006; **26**: 430–437.
- 25 Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001; **7**: 563–568.
- 26 Lodde BM, Mineshiba F, Wang J, Cotrim AP, Afione S, Tak PP *et al*. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**: 195–200.
- 27 Calafat M, Larocca L, Roca V, Pérez Leiros C. NOD mice exocrinopathy: towards a neuroimmune link. *Neuroimmunomodulation* 2007; **14**: 175–181.
- 28 Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Chron's disease. *Neuroimmunomodulation* 2008; **15**: 46–53.
- 29 Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Cañas I, Rosignoli F *et al*. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; **7**: R1034–R1045.
- 30 Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Carrión M, Arranz A, Juarranz Y. Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2007; **14**: 134–138.
- 31 Yadav M, Rosenbaum J, Goetzl EJ. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J Immunol* 2008; **180**: 2772–2776.
- 32 Yadav M, Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide-mediated Th17 differentiation. An expanding spectrum of vasoactive intestinal peptide effects in immunity and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2008; **1144**: 83–89.
- 33 Rosignoli F, Torroba M, Juarranz Y, García-Gómez M, Martínez C, Gomariz RP *et al*. VIP and tolerante induction in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2006; **1070**: 525–530.
- 34 Herrera JL, Fernández-Montesinos R, González-Rey E, Delgado M, Pozo D. Protective role for plasmad DNA-mediated VIP gene transfer in non-obese diabetic mice. *Ann NY Acad Sci* 2006; **1070**: 337–341.
- 35 Larocca L, Calafat M, Roca V, Franchi A, Perez-Leiros C. VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages. *Int Immunopharmacol* 2007; **7**: 1343–1349.
- 36 Calafat M, Larocca L, Roca V, Hauk V, Pregi N, Nesse A *et al*. Vasoactive intestinal peptide inhibits TNF- α -induced apoptotic events in acinar cells from nonobese diabetic mice submandibular glands. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**: R53.

- 1 Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrine Rev* 1994; **15**: 516–542.
- 2 Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009; **5**: 219–226.
- 3 Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Ann Rev Immunol* 2005; **23**: 447–485.
- 4 D'Alise AM, Auyeung V, Feuerer M, Nishio J, Fontenot J, Benoist C *et al*. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proc Natl Acad Sci* 2008; **105**: 19857–19862.
- 5 Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood* 2008; **112**: 1557–1569.
- 6 Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family. Distinct subsets and their interrelation. *J Immunol* 2003; **22**: 6323–6327.

- 37 Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S *et al*. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1853–1862.
- 38 Suarez-Pinzón WL, Mabley JG, Strynadka K, Power RF, Szabo C, Rabinovitch A. An inhibitor of inducible nitric oxide synthase and scavenger of peroxynitrite prevents diabetes development in NOD mice. *J Autoimmun* 2001; **16**: 449–455.
- 39 Traupe T, Nett PC, Frank B, Tornillo L, Hofmann-Lehmann R, Terracciano LM *et al*. Impaired vascular function in normoglycemic mice prone to autoimmune diabetes: role of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2007; **557**: 161–167.
- 40 Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007; **19**: 362–371.
- 41 Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z, Leonard WJ. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 14028–14033.
- 42 Bending D, De La Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B *et al*. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 2009; **119**: 565–572.
- 43 Bluestone JA, Tang Q, Sedwick CE. T regulatory T cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 677–684.
- 44 Wu AJ, Hua H, Munson SH, McDevitt HO. Tumor necrosis factor- α regulation of CD4⁺CD25⁺ T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 12287–12292.
- 45 Batten M, Ghilardi N. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J Mol Med* 2007; **85**: 661–672.
- 46 Ouaked N, Mantel PY, Bassin C, Burgler S, Siegmund K, Akdis CA *et al*. Regulation of the foxp3 gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27- induced STAT1. *J Immunol* 2009; **182**: 1041–1049.
- 47 Koarada S, Wu Y, Olshansky G, Ridgway WM. Increased nonobese diabetic Th1/Th2 (IFN γ /IL-4) ratio is CD4 T cell intrinsic and independent of APC genetic background. *J Immunol* 2002; **169**: 6580–6587.
- 48 Gutierrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL *et al*. Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 2008; **22**: 312–317.
- 49 Von Errath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing–remitting disease? *Nat Rev Immunol* 2007; **7**: 988–994.
- 50 Holohan C, Szegezdi E, Ritter T, O'Brien T, Samali A. Cytokine-induced β -cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL. *J Cell Mol Med* 2008; **12**: 591–606.
- 51 Gutierrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martínez C, Galindo M *et al*. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* 2005; **45**: 527–532.
- 52 Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C *et al*. VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mol Immunol* 2008; **45**: 3065–3073.
- 53 Arranz A, Androulidaki A, Zacharioudaki V, Martínez C, Margioris AN, Gomariz RP *et al*. Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide. *Mol Immunol* 2008; **45**: 2970–2980.
- 54 Krakowski M, Owens T. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1644–1646.
- 55 Kirham BN, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS *et al*. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 1122–1131.
- 56 Harrington L, Mangan P, Weaver C. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 349–356.
- 57 Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B *et al*. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; **421**: 744–748.
- 58 Doodes PD, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Farkas B, Iwakura Y *et al*. Development of proteoglycan-induced arthritis is independent of IL-17. *J Immunol* 2008; **181**: 329–337.
- 59 Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 216–224.
- 60 Chen C, Lee WH, Yun P, Snow P, Liu CP. Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2003; **171**: 733–744.
- 61 Thomas D, Zaccane P, Cooke A. The role of regulatory T cell defects in type 1 diabetes and the potential of these cells for therapy. *Rev Diabet Stud* 2005; **2**: 9–18.
- 62 Lan Y, Ansari A, Lian Z, Gershwin M. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmune Rev* 2005; **4**: 351–363.
- 63 Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 2007; **107**: 3632–3638.
- 64 Chatila T. Molecular mechanisms of regulatory T cell development. *J Clin Immunol* 2008; **28**: 625–630.
- 65 Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol* 2004; **173**: 715–720.
- 66 Raz I, Eldor R, Naparstek Y. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol* 2005; **23**: 128–134.
- 67 Delgado M, Leceta J, Gomariz R, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. *J Immunol* 1999; **163**: 3629–3635.

Discusión

El neuropéptido VIP desempeña múltiples funciones biológicas en el SI, que abarcan las respuestas inmunes innata y adquirida sobre las cuales ejerce diversos efectos. A lo largo de estos trabajos, nosotros nos centramos en la función del péptido sobre las células Th. La modulación de estas células llevado a cabo por VIP constituye un mecanismo inmunomodulador clave sobre el SI. Por su función colaboradora, estos linfocitos desempeñan un papel fundamental en la orquestación de la respuesta inmune, por lo que la regulación de la respuesta ejercida por estas células va mucho más allá del mero hecho de inducir o inhibir la función concreta de un determinado tipo celular. Reflejo de tal importancia, la acción de VIP sobre los linfocitos Th ha sido objeto de numerosos estudios, los cuales han dado lugar a un gran conocimiento acerca de las funciones de VIP sobre los linfocitos Th, especialmente sobre las subpoblaciones Th1, Th2 y Treg. Nosotros decidimos ampliar este conocimiento estudiando en profundidad el efecto de VIP sobre el subconjunto Th17, así como los balances que se establecen entre las distintas subpoblaciones Th. Tal análisis se ha realizado tanto sobre células murinas como sobre células humanas y tanto en condiciones de salud como en condiciones de enfermedad, evaluando tal función del péptido sobre linfocitos procedentes de un modelo experimental de T1D y de pacientes con AR. De tal modo que, en su conjunto, estos cinco artículos realizan un amplio recorrido sobre el estudio de la función de VIP sobre las células Th y, especialmente sobre las Th17. En primer lugar, en el *Artículo 1* mostramos como VIP, además de modular de forma diferencial cada una de las subpoblaciones, regula los equilibrios entre ellas. Con todo, este trabajo realiza un análisis extenso relativo al efecto de este neuropéptido sobre las células Th murinas, aportando nuevos matices sobre el conocimiento previo y sentando las bases del subsiguiente estudio en células Th humanas. Sobre tales células, los estudios previos son escasos comparado con las células Th murinas. Es más, sobre la subpoblación Th17 humana no se conoce cuál es el efecto de este neuropéptido. El descubrimiento de esta subpoblación linfoide ha supuesto un cambio de mentalidad fundamental en el marco del paradigma Th1/Th2 establecido durante décadas, “rompiendo” los esquemas establecidos y dando respuestas a varias incógnitas, a la vez que planteando otras nuevas. Dada su implicación en diversas patologías, se han realizado múltiples esfuerzos por conocer los detalles sobre su generación, función y regulación. Nosotros nos sumamos a estos esfuerzos, centrándonos en el estudio del efecto de VIP sobre la modulación de esta subpoblación. A lo largo de nuestros trabajos, analizamos la función del péptido sobre su diferenciación, activación y polarización, así como su perfil funcional. Comenzando por el *Artículo 2*, analizamos el efecto de VIP sobre la activación de las células Th, poniendo especial hincapié en los linfocitos Th17. A través de este estudio, observamos que este neuropéptido es capaz de inhibir la funcionalidad de este tipo celular, tanto en donantes sanos como en pacientes artríticos. En el *Artículo 5*, describimos también este hallazgo *in vivo* en el modelo NOD. Sin embargo, en el *Artículo 3* estudiamos el efecto de VIP sobre la diferenciación de las células Th17 humanas encontrando un efecto promotor. En la misma línea, el trabajo mostrado en el *Artículo 4*, nos permitió observar el efecto inductor de VIP sobre la polarización de las células memoria Th hacia el fenotipo Th17, tanto en individuos sanos como en pacientes con AR. Advertimos así cómo VIP ejerce un efecto promotor de la subpoblación Th17 cuando las condiciones microambientales así lo requieren. Esta modulación de la

generación y función de los linfocitos Th17, puede dar lugar de forma indirecta a la regulación de una amplia variedad de células sobre las cuales ejercen su acción estos linfocitos. Tales células pueden ser tanto pertenecientes como no pertenecientes al SI, como por ejemplo macrófagos o fibroblastos. Así, el efecto aparentemente concreto de VIP sobre las células Th17, puede suponer una función moduladora mucho mayor. A modo de símil, las células Th17 constituirían la punta de un iceberg y los múltiples efectos que podrían derivarse de su regulación formarían el resto del mismo. Estudiar todos ellos juntos es imposible, sin embargo podemos realizar una pequeña aproximación analizando el fenotipo de estas células, lo que se traducirá en los subsiguientes efectos. El análisis del fenotipo de estos linfocitos ha sido de hecho objeto de intensas investigaciones en los últimos años. Investigaciones que han permitido distinguir entre células Th17 patogénicas y no patogénicas. Teniendo como base el fruto de tales trabajos, nosotros estudiamos el efecto de VIP sobre el perfil patogénico/no patogénico de las células Th humanas activadas *in vitro*, así como sobre las células Th17 diferenciadas y polarizadas en nuestros cultivos. Resultado de estos trabajos describimos que VIP es capaz de inhibir el fenotipo patogénico de las células Th y mantener o aumentar el fenotipo no patogénico de las células Th17 diferenciadas o polarizadas, respectivamente. En suma, todos estos trabajos en su conjunto muestran extensamente el efecto de VIP sobre la subpoblación Th17.

A pesar de su importante implicación en la defensa del huésped, la función de esta subpoblación linfoide se ha resaltado fuertemente en el ámbito de la inflamación y la autoinmunidad. Estudiar la modulación de esta subpoblación en este ámbito resulta de vital importancia teniendo en cuenta la posible utilidad de tales estudios para el tratamiento de este tipo de enfermedades. En base a ello, nosotros quisimos evaluar la función de VIP sobre las células Th y en concreto las células Th17 en el marco de dos enfermedades de este tipo. *In vivo*, utilizamos un modelo experimental murino para analizar el efecto del neuropéptido sobre las células Th en una enfermedad autoinmune específica de tejido, la T1D. Por otra parte, *ex vivo* caracterizamos la función de VIP sobre células humanas Th y específicamente los linfocitos Th17 en una enfermedad autoinmune sistémica, la AR. Referente al primer estudio, nuestro trabajo nos permitió confirmar resultados previos acerca del efecto de VIP sobre células Th1, Th2 o Treg, a la vez que observamos el efecto inhibitorio sobre la función de las células Th17 en los ratones NOD. Además, identificamos la modulación ejercida por el péptido sobre los balances entre las distintas subpoblaciones Th. En conjunto, los resultados de este estudio muestran cómo VIP modula negativamente la función pro-inflamatoria y promueve la función reguladora en el ámbito de la diabetes. Trasladada al ámbito terapéutico, esta modulación podría resultar en un efecto beneficioso sobre el desarrollo de la enfermedad. Así, a través de nuestro trabajo en un modelo experimental, ayudamos a sentar las bases sobre lo que en un futuro podría ser aplicado a los pacientes diabéticos. Sobre individuos artríticos, nuestros estudios son más directos ya que, aunque mediante técnicas *in vitro*, trabajamos con células procedentes de los pacientes. Los resultados de los dos estudios realizados permiten observar que VIP inhibe la respuesta Th17 sobre el conjunto de células Th activadas *in vitro*, a la vez que promueve tal respuesta cuando las condiciones microambientales son favorables. En ambos casos, el péptido inhibe el fenotipo patogénico asociado a

estas células. Las amplias acciones de VIP inhibiendo la inflamación y la degradación de las articulaciones en animales artríticos han puesto “en el punto de mira” a este péptido como agente terapéutico para el tratamiento de pacientes artríticos. La modulación de la respuesta Th17, la cual es una diana terapéutica en la AR, podría constituir un mecanismo valioso para el tratamiento de los individuos que padecen esta enfermedad.

1. Efecto de VIP sobre la activación de los linfocitos Th murinos y humanos

De forma general, se han descrito acciones inhibitoras sobre la subpoblación Th1, inductoras sobre las células Th2 y Treg, y efectos duales sobre el subconjunto Th17. Así mismo, se ha mostrado la función moduladora de VIP sobre el balance Th1/Th2. Sin embargo, no se conoce el efecto de este neuropéptido sobre los balances entre otras subpoblaciones, los cuales también son importantes en los procesos inflamatorios desencadenados tras una infección o en relación a un proceso autoinmune. Además, de forma mayoritaria estos estudios se han realizado sobre células murinas, mientras que apenas existen datos sobre células humanas. Por ello, nos propusimos en primer lugar analizar el efecto de VIP sobre la activación *in vitro* de linfocitos Th murinos, evaluando las diferentes respuestas Th así como sobre los balances entre ellas ([Artículo 1](#)). En segundo lugar, determinamos el perfil de las células memoria Th humanas activadas *in vitro* y valoramos si la presencia del neuropéptido durante la activación linfoide modifica dicho perfil ([Artículo 2](#)).

Referente al **efecto de VIP sobre la activación de las células Th murinas**, observamos que VIP es capaz de modular diferencialmente cada una de las subpoblaciones linfoides así como de regular los balances entre unas y otras favoreciendo las respuestas anti-inflamatorias frente a las pro-inflamatorias. Primeramente, analizamos la función moduladora del péptido de forma individual sobre las diferentes respuestas Th que pueden desarrollarse tras su activación *in vitro*. Para llevar a cabo nuestro propósito, activamos los esplenocitos procedentes de ratones Balb/c permitiendo que las células de interés (los linfocitos Th) se activen en presencia de otros tipos celulares tales como linfocitos T CD8, células B, macrófagos o DCs. El objeto de este tipo de cultivo es “imitar” en mayor medida el proceso de activación de estos linfocitos *in vivo*. En primer lugar evaluamos el **efecto de VIP sobre la subpoblación murina Th17** y observamos que VIP promueve *in vitro* el desarrollo de las células Th17 murinas a la vez que inhibe su funcionalidad. Por un lado, los resultados muestran que en presencia de VIP se promueve la generación de las células Th17 ya que se produce un aumento de los niveles de IL-23 y TGFβ, mientras que la secreción de IL-17, IL-22 y TNFα es menor, lo que implica una disminución de la función de estas células. Relacionado con lo primero, Yadav y colaboradores también indican que VIP promueve el desarrollo de la subpoblación Th17, aunque en ese caso se trata de un proceso de diferenciación hacia Th17 a partir de linfocitos naïve (Yadav *et al.*, 2008). Sin embargo, de acuerdo con el segundo hallazgo, estudios previos en modelos experimentales de AR y enfermedad de Crohn han mostrado que VIP inhibe la función de estas células (Abad *et al.*, 2005; Juarranz *et al.*, 2005; Leceta *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2010).

Referente al **efecto de VIP sobre la subpoblación murina Th1**, advertimos que VIP presenta un efecto inhibitorio sobre la función de esta subpoblación. Los resultados muestran que los niveles de IFN γ y TNF α disminuyen en presencia del neuropéptido, a pesar de que se observa un ligero incremento en la producción de IL-12p70 inducido por VIP a día 3 de cultivo. El efecto inhibitorio observado concuerda con los hallazgos previamente que indican que VIP disminuye el número de células Th productoras de IFN γ (Delgado *et al.*, 1999b). Afín a ello, pero contrario a nuestro resultado, se ha descrito también que VIP inhibe *in vitro* la producción de IL-12 por parte de los macrófagos (Delgado *et al.*, 1999e; Delgado y Ganea, 1999). Es característico observar un efecto dual de VIP dependiendo del estado de activación celular, presentando fundamentalmente acciones potenciadoras sobre células inmunes innatas inactivas y acciones inhibitorias sobre células previamente activadas. En nuestros cultivos únicamente activamos los linfocitos T, por lo que posiblemente las células inmunes innatas se encuentren inactivas. De tal modo que, diferencias en el grado de activación de estas células podrían explicar la discrepancia, dado que en estos trabajos previos el efecto de VIP tiene lugar sobre macrófagos estimulados. No obstante, la presencia en el cultivo de otros tipos celulares capaces de secretar esta citocina, tales como DCs, también puede ser la causa del resultado inesperado. En este sentido, se ha descrito que VIP induce la secreción de IL-12 en DCs (Lu *et al.*, 2008b).

Con respecto a la **función de VIP sobre la subpoblación murina Th2**, no se ha podido determinar el efecto concreto del péptido sobre este tipo celular. El análisis de expresión de la IL-4 indica que la presencia de VIP conduce a un aumento en la misma, mientras que su producción se encuentra disminuida cuando VIP está presente en el cultivo, contrariamente a lo esperado. Aunque sería necesario investigar en profundidad esta cuestión, esta discrepancia puede estar relacionada con mecanismos post-transcripcionales que podrían estar involucrados en la disminución de la traducción de la proteína. Previamente se ha descrito que VIP promueve el desarrollo de células secretoras de IL-4 (Delgado *et al.*, 1999b). Nuestros resultados a nivel de expresión de mRNA concuerdan con este efecto descrito, mientras que los resultados obtenidos a nivel de proteína son contrarios.

Finalmente, el análisis del **efecto de VIP sobre la subpoblación murina Treg** sorprendentemente sugiere que VIP inhibe la respuesta de tipo Treg en nuestros cultivos *in vitro*. La caracterización del porcentaje de células dobles positivas para CD4 y CD25 muestra que, contrario a lo esperado, este porcentaje es menor en la presencia de VIP comparado con las células estimuladas en ausencia del péptido a día 5 de cultivo. No obstante, la expresión de CD25 no es exclusiva de las células Treg, pudiendo encontrarse en general en los linfocitos Th activados, aunque tal expresión es transitoria y de bajo nivel, mientras que la expresión es alta y sostenida en la subpoblación Treg (Malek y Castro, 2010). Por otra parte, el análisis de expresión de Foxp3 muestra que la presencia de VIP en el cultivo induce esta expresión a día 1 y 2 de cultivo, pero la inhibe a día 5. Con objeto de testar el efecto de VIP sobre la funcionalidad de estas células, analizamos la producción de TGF β e IL-10, y observamos que VIP induce un aumento en los niveles de TGF β , mientras que, en la misma línea que los resultados descritos, disminuye la producción de IL-10. Estos hallazgos son contrarios al efecto descrito previamente sobre esta subpoblación (Chorny *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2005a; Delgado *et al.*,

2005b; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006; Pozo *et al.*, 2009; Andersson y Gonzalez-Rey, 2010). Por ello, reevaluamos de nuevo el efecto de VIP sobre la subpoblación Treg pero en la ausencia de IL-2. Esta citocina se ha empleado en nuestros cultivos de activación de esplenocitos para promover la expansión *in vitro* de los linfocitos. Sin embargo, se ha descrito que la IL-2 influye sobre los efectos mediados por VIP, pudiendo revertirlos cuando está presente en el medio de cultivo junto al péptido (Pozo *et al.*, 2009; Andersson y Gonzalez-Rey, 2010). Los resultados muestran que, en la presencia de VIP, tanto el porcentaje de células dobles positivas como la expresión de Foxp3, es mayor en ausencia de IL-2 a 5 días de cultivo. Por tanto, de alguna manera, la presencia de la citocina afecta de modo negativo al efecto de VIP sobre la subpoblación Treg. No se ha podido determinar cómo se produce este efecto, por lo que serían necesarios nuevos estudios que contribuyesen a discernir sobre los mecanismos involucrados en ello. En suma, teniendo en cuenta el efecto mediado únicamente por VIP, los resultados sugieren que VIP promueve *in vitro* la respuesta de tipo Treg.

Los linfocitos Th diferenciados son células plásticas que muestran flexibilidad tanto en la producción de citocinas como en la expresión de factores de transcripción. Los diferentes estudios acerca de la plasticidad linfocítica en los que se ha mostrado la co-expresión de factores de transcripción, cuestionan el concepto clásico de la existencia de un *master regulator* para cada fenotipo Th. Tales trabajos apuntan hacia un nuevo punto de vista en el cual cada subpoblación celular muestra gradientes de expresión de los distintos *master regulators*. En base a esto, Oestreich y Weinmann proponen el cambio de terminología "*master regulator*" por "*lineage-defining*" o "*lineage-specifying*" (Oestreich y Weinmann, 2012b). Los autores plantean que esta nueva nomenclatura refleja la necesidad de estos factores de transcripción para definir los subtipos de células Th, pero restando importancia a los conceptos de expresión "todo o nada" y de fenotipo completamente estable asociados a la expresión de un único factor de transcripción específico de linaje. Teniendo en cuenta el nuevo concepto *lineage-defining transcription factors*, así como la flexibilidad y co-expresión de citocinas, los trabajos de los últimos años trazan un nuevo enfoque. En él, lo importante no es determinar la ausencia o presencia de una citocina determinada o un factor de transcripción concreto, sino considerar los balances, gradientes o ratios entre unos y otros, ya que la producción y expresión de los mismos puede co-existir y variar durante el curso de la estimulación inmune. Por ello, consideramos importante tener en cuenta este nuevo enfoque a la hora de analizar los efectos que VIP puede mediar sobre los linfocitos Th. De tal manera que, en el presente trabajo nos propusimos estudiar la función moduladora de VIP sobre los balances entre la expresión de factores de transcripción y citocinas de diferentes subpoblaciones.

En primer lugar, analizamos **el efecto de VIP sobre balance entre las subpoblaciones murinas Th17 y Th1**, observando que VIP promueve un aumento de la respuesta Th17 frente a la respuesta Th1 tras la activación *in vitro* de los esplenocitos. Esto se advierte ya que el análisis de los ratios entre IL-23 e IL-12, entre ROR γ t y T-bet y entre IL-17 e IFN γ , indica un aumento de los mismos en la presencia del péptido. Seguidamente, **caracterizamos el efecto de VIP sobre el balance entre los linfocitos murinos Th1 y Th2**, encontrando que VIP promueve un aumento de la respuesta Th2 frente

a la respuesta Th1 tras la activación *in vitro* de los esplenocitos. El análisis de los ratios entre T-bet y GATA3 y entre IFN γ e IL-4 muestra una disminución del mismo en la presencia de VIP. Estos hallazgos concuerdan con lo anteriormente descrito (Delgado *et al.*, 1999b; Delgado y Ganea, 2001c; Delgado *et al.*, 2002c; Delgado *et al.*, 2004b; Jiang *et al.*, 2002; Voice *et al.*, 2004; Rosignoli *et al.*, 2006). Dado el carácter pro-inflamatorio y anti-inflamatorio asociado a la subpoblación Th1 y Th2 respectivamente, el efecto de VIP sobre el balance entre ambas subpoblaciones puede ejercer un efecto beneficioso en patologías autoinmunes. Posteriormente, comprobamos el **efecto de VIP sobre el balance entre las células murinas Th2 y Th9**, observando que VIP promueve la respuesta Th2 frente a la respuesta Th9 tras la activación *in vitro* de los esplenocitos. El análisis del ratio entre la expresión de IL-4 e IL-9 indica que en presencia del péptido este ratio se incrementa. En la misma línea la correlación entre ambas citocinas, positiva en ausencia del péptido, es negativa cuando VIP está presente en el cultivo. Este estudio constituye el primer trabajo en el que se describe tal efecto. Ambas subpoblaciones están estrechamente relacionadas. De hecho, se ha descrito que las células Th9 provienen de linfocitos Th2 (Veldhoen *et al.*, 2008a). Teniendo en cuenta los resultados de nuestro estudio, podría pensarse que VIP puede influir negativamente sobre la posibilidad de que las células Th2 se re-programen hacia Th9. No obstante, para poder caracterizar exactamente el efecto de VIP sobre la re-diferenciación de las células Th2 hacia Th9 sería preciso realizar un estudio en profundidad al respecto de esta cuestión. Por otra parte, en relación a su función, ambas subpoblaciones se han relacionado mayormente con la defensa anti-helmíntica pero también con inflamación alérgica crónica (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008a; Chang *et al.*, 2010; Allen y Maizels, 2011; Jones *et al.*, 2012; Kerzerho *et al.*, 2013; Kudo *et al.*, 2013; Licona-Limón *et al.*, 2013; Romeo *et al.*, 2014). En este sentido, la modulación ejercida por VIP sobre el balance entre ambos subconjuntos linfoides podría suponer un efecto beneficioso en relación a la patología inflamatoria alérgica. Por otra parte, estudiamos el **efecto de VIP sobre el balance entre los linfocitos murinos iTreg y Th17** sin observar una función claramente definida. En presencia de VIP los ratios entre Foxp3 y ROR γ t y entre TGF β e IL-6 muestran una disminución, mientras que el ratio entre TGF β e IL-17 se incrementa y el ratio IL-10/IL-17 no muestra diferencias en presencia respecto a en ausencia del péptido. Por tanto, los resultados no son definitivos. Como se describe anteriormente, los efectos de VIP sobre la subpoblación Treg pueden verse alterados por la presencia de IL-2 en el medio de cultivo, lo cual podría afectar también al balance entre estos dos subconjuntos linfoides. En este sentido, observamos que VIP induce un aumento en el ratio Foxp3/ROR γ t en ausencia de IL-2. De manera que, los resultados sugieren que VIP promueve la respuesta de tipo Treg sobre la respuesta Th17 tras la activación *in vitro* de los esplenocitos en ausencia de IL-2. Finalmente, caracterizamos el **efecto de VIP sobre el balance entre las células murinas iTreg y Th1**, observando que a nivel funcional VIP promueve la respuesta de tipo Treg sobre la respuesta Th1 tras la activación *in vitro* de los esplenocitos. Aunque el análisis del ratio entre Foxp3 y T-bet muestra que en presencia de VIP éste se ve disminuido, los ratios TGF β /IFN γ e IL-10/IFN γ se incrementan por efecto del péptido. Teniendo en cuenta la función inmunomoduladora de los linfocitos Treg y las acciones pro-inflamatorias de las

células Th17 y Th1, es posible concluir que la modulación ejercida por VIP sobre el balance entre estas subpoblaciones puede dar lugar a un efecto beneficioso que impida el desarrollo de inflamación.

Referente al **efecto de VIP sobre la activación de las células Th humanas**, prestamos especial atención al efecto del péptido sobre la subpoblación Th17 observando que VIP es capaz de inhibir la respuesta Th17 sobre el conjunto de linfocitos humanos Th activados *in vitro*. Primeramente determinamos la presencia de células Th17 tras la activación *in vitro* detectando que las células Th activadas expresan RORC, RORA y STAT3 y producen IL-17 e IL-21. Esta elevada presencia de las células Th17 concuerda con datos publicados previamente, ya que se ha descrito que tras la activación de linfocitos memoria humanos a través de la vía CD3/CD28 se produce un incremento en la expresión de RORC e IL-17 (Chen *et al.*, 2007). Seguidamente quisimos evaluar la función de VIP para lo cual previamente caracterizamos la expresión de los receptores en las células Th tras su activación *in vitro*. Puesto que la modulación que ejerce VIP sobre las subpoblaciones linfoides Th tiene lugar a través de la expresión de los receptores VPAC₁ y VPAC₂, ya que PAC₁ no se expresa en este tipo celular (Pozo *et al.*, 1997; Vomhof-Dekrey y Dorsam, 2008; Dorsam *et al.*, 2011), determinamos la expresión de VPAC₁ y VPAC₂ en las células Th activadas *in vitro*. Tal y como las publicaciones anteriores muestran, ambos tipos de receptores se expresan en los linfocitos de nuestros cultivos. A través de estos receptores VIP modula las respuestas de las células Th mostrando una disminución en la expresión de STAT3, IL-23R e IL-21R sobre el conjunto de células Th activadas. Estos hallazgos están en concordancia con los resultados obtenidos sobre células Th murinas activadas *in vitro* (Artículo 1).

Los resultados encontrados acerca del efecto de VIP sobre la respuesta Th17 tras la activación general del conjunto de células Th, nos llevaron a profundizar en los posibles efectos que VIP puede ejercer específicamente sobre las células Th17. Por ello, nuestros siguientes objetivos se centraron en el estudio de la función del péptido sobre la diferenciación de las células Th17 humanas procedentes de células Th naïve (Apartado 2, Discusión), así como sobre la polarización de células Th17 humanas a partir de linfocitos memoria (Apartado 3, Discusión).

2. Efecto de VIP sobre la diferenciación de las células Th17 humanas

La diferenciación de las células Th17 es un proceso complejo que está fuertemente regulado, por citocinas, factores de transcripción y otros moduladores. La regulación positiva es importante dada su función fisiológica, mientras que su regulación negativa es también fundamental ya que su sobre-activación está implicada en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Por ello, nos propusimos evaluar la regulación mediada por VIP sobre el proceso de diferenciación *in vitro* de las células Th17 humanas a partir de linfocitos Th naïve (Artículo 3).

En nuestro estudio, activamos células Th naïve en condiciones de diferenciación hacia la subpoblación subtipo Th17, bloqueando la diferenciación hacia los subconjuntos Th1 y Th2. Los resultados obtenidos permiten concluir que VIP ejerce un efecto inductor sobre la diferenciación *in*

vitro de las células Th17 humanas. En primer lugar, previo al análisis del efecto del neuropéptido corroboramos que el proceso de diferenciación tiene lugar con éxito ya que tras siete días de cultivo las células presentan un aumento de la producción de IL-17 e IL-21, así como un aumento en la expresión de RORC, RORA e IL-23R. Por su parte, marcadores asociados a otras subpoblaciones, como por ejemplo Th1 (IFN γ y T-bet) se encuentran disminuidos, lo cual era esperado ya que en el cultivo se emplean anticuerpos anti-IL-12p35 y anti-IL-4 para bloquear el desarrollo de otras subpoblaciones linfoides. Una vez testado el proceso de diferenciación *in vitro* caracterizamos el efecto de VIP sobre el mismo. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que VIP induce la expresión de mRNA de IL-23R, RORC, RORA y STAT3. De manera que VIP, al aumentar la expresión de los factores de transcripción, promueve la diferenciación completa de esta subpoblación, dado que estos factores de transcripción activan toda la maquinaria transcripcional involucrada en el desarrollo de las células Th17. Por otro lado, al inducir el aumento de la expresión de IL-23R, VIP promueve la fase final de la diferenciación, favoreciendo la respuesta a la IL-23 y por tanto la estabilización del clon diferenciado. Esta inducción de la diferenciación se traduce en un aumento de la expresión de IL-17 a nivel de mRNA. Sin embargo, la expresión proteica de esta citocina es menor en la presencia de VIP. Esta disminución en la expresión de IL-17 a nivel de proteína inducida por VIP se observa también en células Th murinas activadas *in vitro* en la presencia del péptido ([Artículo 1](#)). La discrepancia entre los resultados obtenidos a un nivel y otro puede deberse a mecanismos post-transcripcionales que podrían estar involucrados en la disminución de la traducción de la proteína. No obstante, sería necesario realizar estudios en profundidad en este sentido para confirmar esta hipótesis. En relación a los procesos de diferenciación, se ha descrito que VIP promueve la diferenciación de las células Th2 y Treg e inhibe la diferenciación de las células Th1 (Delgado *et al.*, 1999b; Delgado *et al.*, 2005a). Sin embargo, en el caso de la subpoblación Th17, la modulación de VIP sobre la diferenciación de estas células no se ha estudiado en células humanas, aunque, como se menciona anteriormente, se ha publicado un artículo sobre tal efecto en células murinas (Yadav *et al.*, 2008). En su estudio, Yadav y colaboradores describen un efecto promotor de la diferenciación de los linfocitos Th17, lo cual también se observa en nuestro trabajo.

Por otra parte, determinamos la expresión de los receptores VPAC₁ y VPAC₂ en las células naïve y las células Th17. El análisis de la expresión de los receptores muestra que durante el proceso de diferenciación se produce un cambio en el patrón de expresión de los receptores ya que, al contrario que las células naïve, las células Th17 diferenciadas muestran una mayor expresión de VPAC₂ que VPAC₁. Aunque este aumento se observa también en las células activadas en ausencia de condiciones de polarización, sin embargo el ratio VPAC₂/VPAC₁ es significativamente mayor en las células Th17. La disminución observada en el nivel de expresión de VPAC₁ tras siete días de cultivo está en concordancia con los hallazgos publicados anteriormente, ya que se ha descrito una disminución en la expresión del receptor durante la activación de las células Th *in vitro* previamente (Lara-Marquez *et al.*, 2001; Vomhof-DeKrey *et al.*, 2008). Por su parte, el aumento de la expresión de VPAC₂ también era esperado, puesto que se ha mostrado que la expresión de este receptor es

inducible, mostrando un aumento en respuesta a la activación de los linfocitos con anti-CD3 (Delgado *et al.*, 1996d). Sin embargo, sobre las células Th17, no se ha descrito previamente la relación entre la expresión de ambos receptores, ni el aumento de la expresión de VPAC₂. Yadav y colaboradores han analizado el efecto de VIP sobre ratones sanos y en ratones deficientes para el receptor VPAC₂ (Yadav *et al.*, 2008). Estos autores proponen que la expresión de VPAC₁ en las células naïve se encuentra implicada en la respuesta de estas células al péptido durante la diferenciación hacia células Th17. De acuerdo con esta propuesta, nosotros podemos pensar que el receptor VPAC₁, mayormente expresado en las células Th naïve, estaría involucrado durante al principio de la diferenciación, mientras que VPAC₂, cuya expresión es mayoritaria en las células diferenciadas, estaría implicado en estadios más tardíos del proceso de diferenciación. Analizamos también la acción del péptido sobre la expresión de sus propios receptores y observamos que VIP disminuye la primacía de VPAC₂ sobre VPAC₁ en las células Th17 diferenciadas *in vitro*. Los resultados muestran que, aunque a nivel individual no se observan diferencias en la expresión de los receptores en presencia de VIP, el neuropéptido causa una disminución del ratio VPAC₂/VPAC₁. Esta disminución viene dada ya que el ligero aumento de la expresión de VPAC₁ es mayor que el de VPAC₂. En este sentido, Delgado y colaboradores previamente han descrito que VIP induce un modesto incremento en la expresión de VPAC₁ en timocitos y esplenocitos murinos estimulados o no *in vitro* (Delgado *et al.*, 1996d). Sin embargo, el aumento en la expresión de VPAC₂ sólo se observa en células no estimuladas, mientras que las células estimuladas presentan similar expresión de VPAC₂ en presencia o ausencia de VIP. Estos hallazgos se asemejan a los encontrados en nuestro estudio. Aunque son necesarios más estudios, es posible suponer que la acción de VIP sobre sus propios receptores podría tener repercusiones en los efectos mediados por el péptido en los linfocitos Th.

Los receptores VPAC₁ y VPAC₂ promueven la vía de señalización intracelular que conduce a la producción de cAMP, activación de PKA y finalmente aumento de Ca²⁺ intracelular. Esta vía de señalización está fuertemente involucrada en el proceso de diferenciación linfocítica de los linfocitos Th17 (Li *et al.*, 2012c) y el bloqueo de la misma induce un déficit en el proceso de diferenciación (Yadav *et al.*, 2008). Por ello, no es de extrañar el efecto inductor de la diferenciación observado en nuestro estudio, ya que la activación de esta vía ejercida por ambos receptores puede conducir a un aumento de la diferenciación de este tipo celular. No obstante, a pesar de ejercer un mismo efecto final promotor de la diferenciación, ambos tipos de receptores podrían desencadenar efectos concretos diferentes. En base a ello, quisimos testar la especificidad de los receptores evaluando los efectos mediados por cada uno de ellos. Para ello diferenciamos las células Th naïve hacia células Th17 en la presencia de un agonista de VPAC₁, un agonista de VPAC₂ y un antagonista de VPAC₁. En su conjunto, los resultados obtenidos en esta parte del estudio sugieren que el neuropéptido VIP es capaz de promover la diferenciación de las células Th17 en los diferentes estadios de la misma a través de ambos receptores, presentando VPAC₁ una función mayoritaria al inicio del proceso y VPAC₂ durante la diferenciación terminal. En primer lugar, los resultados muestran que la expresión de moléculas clave en la diferenciación y función de las células Th17, tales como sus factores de transcripción

definitorios de linaje y su citocina característica, pueden ser inducidos por VIP mediante los dos receptores. Dada la importancia de estas moléculas sobre el desarrollo y la actividad funcional de estas células, el hecho de que ambos receptores medien los efectos de VIP sobre su expresión es interesante, puesto que en ausencia de uno de los receptores el efecto puede ser mediado a través del otro. No obstante, aunque ambos receptores inducen la expresión de RORC, RORA e IL-17, el efecto inductor sobre RORC e IL-17 es algo mayor en el caso de VPAC₁ que VPAC₂. Este dato concuerda en cierto modo con los hallazgos publicados por Yadav y colaboradores, los cuales describen que la inducción de la expresión de IL-17 por VIP se produce a través de VPAC₁. Sin embargo, nosotros proponemos que, aunque existe mayor efecto a través de este receptor, ambos están involucrados. Los autores del trabajo citado, indican que VPAC₁ media la expresión de la citocina ya que las células procedentes de ratones deficientes para VPAC₂ producen más IL-17 que las de los ratones *wild type*. Sin embargo, en sus experimentos no muestran el bloqueo de la señalización mediada por VPAC₁. En base a nuestros hallazgos, es posible que tal bloqueo resultase en una disminución de la expresión de la citocina, pero no en una inhibición completa de la misma. Por otra parte, en nuestro trabajo se observa que VIP estimula la expresión de STAT3 gracias a VPAC₁. El aumento en la expresión de este factor de transcripción mediado por VIP ya ha sido publicado previamente, pero en células de carcinoma renal (Vacas *et al.*, 2012). Aunque este factor de transcripción no es exclusivo de las células Th17, su función en la diferenciación de esta subpoblación es fundamental, por lo que cabe preguntarse por qué STAT3 no es inducido también por VPAC₂. A este respecto, aunque no se conoce la secuencia temporal de la maquinaria transcripcional activada durante la diferenciación de las células Th17, se ha descrito que STAT3 es capaz de promover la expresión de RORC (Yang *et al.*, 2007; Durant *et al.*, 2010). Por ello, se ha sugerido que la diferenciación de las células Th17 podría involucrar la activación de STAT3 en un estadio muy temprano, previo incluso a la expresión de RORC (Yang *et al.*, 2007). En la misma línea, el receptor VPAC₁ está principalmente asociado con el comienzo de la diferenciación, lo que estaría relacionado con la inducción de la expresión de un factor de transcripción que es necesario al comienzo del proceso. No obstante, dada la falta de conocimiento al respecto de la función de los factores de transcripción durante las distintas fases, se necesitan realizar más estudios para concluir esto fehacientemente. Finalmente, nuestros resultados muestran que VIP induce la expresión de IL-23R mediante VPAC₂. Parece lógico que el receptor mayormente expresado en estadios tardíos de la diferenciación sea el encargado de mediar la expresión de IL-23R, cuya función se asocia con la diferenciación terminal y estabilización de estas células.

El sorprendente efecto mostrado por VIP sobre la diferenciación de las células Th17 procedentes de células naïve nos llevó a plantearnos cuál sería la función del péptido sobre la generación de las células Th17 a partir de células memoria.

3. Efecto de VIP sobre la polarización de las células Th17 humanas

Los linfocitos Th son células plásticas que, una vez diferenciadas, retienen la capacidad para re-programarse hacia otras subpoblaciones linfoides dependiendo de la estimulación recibida en el microambiente concreto en que se encuentran estas células. Las citocinas son los principales componentes microambientales que modulan este proceso, sin embargo es posible que otros factores lo modulen. Teniendo en cuenta esto, nos planteamos valorar la modulación de VIP sobre el proceso de polarización *in vitro* de las células memoria Th humanas hacia células Th17 ([Artículo 4](#)).

Para llevar a cabo nuestro propósito, activamos células Th memoria en condiciones polarizantes hacia el subtipo Th17, bloqueando la polarización hacia las subpoblaciones Th1 y Th2. De forma general, los resultados de nuestro estudio muestran que la presencia de VIP durante la polarización *in vitro* de las células Th17 promueve el proceso de polarización de las células memoria Th hacia el fenotipo Th17. En primer lugar, evaluamos si en nuestras condiciones experimentales se produce el proceso de polarización, comprobando que bajo nuestras condiciones de experimentación, se favorece el subtipo Th17 sobre otros subconjuntos Th tras la polarización *in vitro*. Los resultados permiten observar que tras la polarización se produce un aumento de la producción de IL-17 e IL-21, así como un incremento en la expresión de RORC, RORA e IL-23R comparado con las células activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Por otra parte, los niveles de expresión de factores de transcripción propios de otras subpoblaciones, como T-bet y Foxp3, disminuyen tras la polarización. Seguidamente, evaluamos el efecto del neuropéptido sobre el proceso de polarización de estas células. Para ello previamente caracterizamos la expresión de sus receptores, observando que tras la polarización *in vitro*, las células Th17 presentan una menor expresión de VPAC₁ y niveles similares de VPAC₂ que las células activadas *in vitro* en condiciones no polarizantes (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Esto se traduce en un aumento en el ratio VPAC₂/VPAC₁ en las células Th17. Como se describe en el apartado anterior, este incremento en el balance entre ambos tipos de receptores se observa también en el caso de las células Th17 diferenciadas *in vitro* ([Artículo 3](#)). De manera que la expresión aumentada de VPAC₂ respecto a VPAC₁ parece una característica propia de las células Th17.

El efecto inductor de VIP sobre la polarización *in vitro* de las células Th17 se manifiesta en el incremento de marcadores característicos de estas células tales como IL-17, IL-21 y RORC. Sin embargo, la expresión de IL-23R disminuye cuando VIP está presente, aunque este efecto también se observa sobre las células Th activadas en condiciones no polarizantes. A este respecto, los resultados obtenidos durante la diferenciación *in vitro* muestran un efecto inductor sobre la expresión de IL-23R ([Artículo 3](#)), por lo que podría esperarse un aumento de tal expresión. Anteriormente se relaciona el efecto del péptido sobre la expresión de este receptor con la función de VPAC₂. Por tanto, la menor expresión de VPAC₂ en las células Th17 polarizadas respecto a las diferencias *in vitro* podría en cierto modo explicar esta discrepancia (análisis comparado, [Artículos 3 y 4](#)). No obstante, el posible significado fisiológico es quizá más interesante. Dada la necesidad de la IL-23 para la diferenciación

completa de la subpoblación Th17 a partir de linfocitos naïve, la modulación positiva ejercida por VIP durante el proceso de diferenciación conduce a la promoción de la generación de las células Th17. Sin embargo, una vez diferenciadas la expresión de IL-23R es necesaria para el mantenimiento y estabilización de la población, pero una sobre-expresión se ha relacionado con el fenotipo patogénico de estas células (Ghoreschi *et al.*, 2011; Zúñiga *et al.*, 2013). Así, el efecto negativo del neuropéptido sobre la expresión del receptor puede evitar una respuesta masiva de las células Th17 maduras que se asocie con la adquisición de un fenotipo patogénico. En la misma línea, la IL-23 también se ha relacionado con la plasticidad de las células Th17 hacia Th1 y ello a su vez se ha asociado con la patogenicidad de las mismas (Mathur *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Hirota *et al.*, 2011; Duhen *et al.*, 2013). Por tanto, la inhibición mediada por VIP sobre IL-23R podría influir negativamente sobre esta conversión de las células Th17 hacia un fenotipo más patogénico de tipo Th1¹. Independientemente del efecto específico encontrado sobre la expresión de IL-23R, observamos un efecto inductor de VIP sobre la generación de las células Th17. En concordancia con ello, Ding y colaboradores han mostrado también una acción promotora, aunque indirecta, sobre el desarrollo de células Th17 indicando que VIP aumenta la expresión de ROR γ t y la producción de IL-17 en las células T CD4 tras la presentación antigénica (Ding *et al.*, 2012). El hallazgo observado en nuestro estudio concuerda con la conclusión obtenida a partir de células Th17 diferenciadas *in vitro*. Por tanto, VIP promueve de forma generalizada el aumento de la diferenciación y la polarización *in vitro* de las células Th hacia la subpoblación Th17.

Este efecto de VIP promotor de la subpoblación Th17 podría parecer contrario a los resultados obtenidos sobre la activación *in vitro* en condiciones no polarizantes de células Th ([Artículo 2](#)). No obstante, ambas situaciones son diferentes. El efecto de VIP en el primer caso se ejerce sobre un conjunto de células memoria Th que simplemente son activadas a través del TCR en ausencia de cualquier citocina. Sin embargo, en el segundo caso, VIP ejerce un efecto sobre un conjunto de células memoria Th que son, no sólo activadas, sino también polarizadas hacia Th17 en la presencia de un cóctel de citocinas. En estos cultivos por tanto, VIP no ejerce su efecto en solitario, sino en combinación con TGF β , IL-6, IL-1 β , IL-21 e IL-23. Ello puede dar lugar a diferentes efectos biológicos sobre un mismo tipo celular. En este sentido, el trabajo realizado por Yadav y colaboradores puede mostrar alguna evidencia en apoyo a esta hipótesis. En su estudio los autores encuentran que VIP sólo no ejerce un efecto sobre la producción de IL-17, mientras que la presencia combinada del péptido y TGF β induce un incremento en tal producción (Yadav *et al.*, 2008). Los autores indican que los efectos de VIP sobre la inducción de las células Th17 ocurren sólo en la presencia de esta citocina, lo que puede dar credibilidad a la hipótesis planteada.

Tras la caracterización del efecto de VIP sobre la generación de las células Th17 tanto procedentes de linfocitos Th naïve como memoria, caracterizamos parámetros funcionales de las

¹ Los Apartados 5 y 6 de la Discusión exponen en profundidad los efectos de VIP sobre la patogenicidad y el perfil Th17/1 de las células Th17.

mismas, así como de las células Th activadas *in vitro* y evaluamos la capacidad de VIP para modularlos.

4. Efecto de VIP sobre parámetros funcionales de las células Th17 humanas

La funcionalidad de los linfocitos Th está asociada fundamentalmente a la capacidad que presentan estas células de secretar citocinas, sin embargo, existen también otras cualidades importantes para la función de estas células. En este sentido, las células, para ser efectivas en su acción, deben proliferar permitiendo la expansión del clon activado tras la presentación antigénica. Por otra parte, para poder ejercer su acción, los linfocitos Th deben acudir al lugar del foco infeccioso. Por ello, nos propusimos caracterizar la capacidad de proliferación y la capacidad potencial de migración de las células Th17 diferenciadas *in vitro* (Artículo 3), las células Th activadas *in vitro* (Artículo 2) y las células Th17 polarizadas *in vitro* (Artículo 4), así como evaluar si VIP es capaz de modificar estos parámetros funcionales.

En relación al **efecto de VIP sobre la proliferación de las células Th17 diferenciadas *in vitro***, los resultados muestran un efecto inductor por parte del neuropéptido. En primer lugar observamos que, tras siete días de cultivo, las células Th17 muestran mayor ratio de proliferación que las células activadas pero sin condiciones de diferenciación hacia Th17. En segundo lugar, encontramos que el 83% de las células son dobles positivas para RORC y Ki67, lo que indica que la mayoría de las células proliferantes del cultivo son Th17. Además, el análisis de citometría muestra que el 100% de las células que expresan RORC son positivas para Ki67, lo que supone que todas las células Th17 del cultivo están proliferando. Estos datos concuerdan con el hecho de que las células Th17 se diferencian bien en nuestras condiciones de experimentación. Contrario a nuestro hallazgo, se ha descrito una baja capacidad de proliferar y producir IL-2 por parte de células Th17 en respuesta a la activación *in vitro* mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Santarlasci *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros resultados indican que las células, además de proliferar bien, secretan IL-2. Es preciso constar que, para los estudios de proliferación, los autores de este estudio parten de células procedentes de sangre periférica en lugar de células naïve provenientes de sangre de cordón umbilical, lo cual puede repercutir en las diferencias observadas entre ambos trabajos. Además, las discrepancias podrían explicarse debido a la presencia de IL-23 así como el incremento en la expresión de IL-23R en las células Th17, lo que puede dar lugar a un aumento en la expansión de la subpoblación. No obstante, Santarlasci y colaboradores miden la capacidad de proliferación tras cinco días de cultivo. Similar a sus resultados, en nuestro estudio nosotros no observamos aumentada la capacidad de proliferación de las células Th17 después de cuatro días de cultivo. Por lo que, posiblemente ambos hallazgos sean compatibles. Por su parte, el análisis del efecto de VIP muestra que las células diferenciadas en presencia de VIP presentan un ratio de proliferación mayor a los siete días de cultivo. Dado que no existen diferencias entre las células Th17 diferenciadas en ausencia o en presencia del péptido en relación a la viabilidad celular, el efecto del péptido no se debe a un aumento de la supervivencia de estas células, sino a una inducción de la proliferación. Sin embargo, contrario al dato previo, los

resultados de citometría no muestran un aumento del porcentaje de células dobles positivas para RORC y Ki67. En este sentido, BrdU se incorpora en el ADN sólo durante la fase S del ciclo celular, mientras que Ki67 se expresa durante todas las fases del mismo. Teniendo en cuenta esto, un posible efecto de VIP específicamente sobre la fase S, podría no observarse en el análisis de expresión de Ki67 dada la alta expresión de esta proteína en las células Th17 diferenciadas *in vitro*. No obstante, sería necesario realizar estudios en profundidad acerca de ello para poder dilucidar la razón concreta de esta discrepancia. En relación al efecto de VIP sobre la proliferación específica de células Th17 no se ha publicado nada al respecto. Sobre linfocitos T murinos se ha descrito generalmente un efecto inhibitor (Ottaway y Greenberg, 1984; Stanisz, 1986; Ottaway, 1987; Boudard y Bastide, 1991; Teresi *et al.*, 1996), sin embargo en células T humanas Nordlind y colaboradores han descrito un efecto dual o inductor de la proliferación de los linfocitos expuestos a diferentes agentes (Nordlind y Mutt, 1986a; Nordlind y Mutt, 1986b). El hecho de que VIP favorezca la proliferación de estas células concurre con que promueva la diferenciación de este tipo celular, mostrando así que el péptido fomenta la respuesta Th17 a varios niveles.

Referente al **efecto de VIP sobre la proliferación de las células Th activadas *in vitro***, observamos que en presencia de VIP se mantiene esta capacidad funcional en estas células. En primer lugar, determinamos la capacidad de proliferación de los linfocitos Th17 analizando el porcentaje de células dobles positivas para RORC y Ki67 tras el cultivo *in vitro* y advertimos que este porcentaje es 58% aproximadamente. Por tanto, relativamente existe una elevada proliferación de esta subpoblación celular en nuestros cultivos comparado con otros subtipos Th, lo que concuerda con los hallazgos anteriormente expuestos (*Apartado 1, Discusión*). Por su parte, el análisis de la función de VIP sobre la proliferación de estas células no muestra un efecto significativo del péptido sobre este parámetro funcional, manteniendo por tanto la capacidad proliferativa que presentan las células Th.

Finalmente, el análisis del **efecto de VIP sobre la proliferación de las células Th17 polarizadas *in vitro***, muestra de nuevo este neuropéptido mantiene la capacidad proliferativa que presentan estas células *per se*. Los resultados obtenidos indican que aproximadamente un 36% de las células Th17 son dobles positivas para RORC y Ki67. Comparado con las células activadas en condiciones no polarizantes, este porcentaje indica que las células Th17 polarizadas *in vitro* proliferan menos, contrariamente a lo esperado (datos comparados, *Artículos 2 y 4*). Este hallazgo puede ser acorde con la evidencia mostrada por Santarlasci y colaboradores, dado que en este caso se parte también de linfocitos procedentes de sangre periférica (Santarlasci *et al.*, 2012). El estudio del efecto de VIP tampoco muestra diferencias significativas respecto a las células polarizadas en ausencia del péptido.

Por otra parte, el estudio del **efecto de VIP sobre la capacidad potencial de migración de las células Th17 diferenciadas *in vitro*** muestra que VIP mantiene la capacidad que por sí mismas presentan estas células. En primer lugar, los resultados manifiestan que aproximadamente un 75% de las células son dobles positivas para RORC y CCR6, lo que sugiere que la mayoría de estas células tienen la capacidad de migrar en respuesta a CCL20. Un 25% de las células Th17 diferenciadas en el

cultivo no expresan CCR6. Dado que este receptor de quimiocinas se expresa en el subconjunto de células T memoria (Schutyser *et al.*, 2003), es posible que este porcentaje corresponda a células que aún no han terminado su proceso de diferenciación. Por su parte, no se encuentran diferencias en el porcentaje de células dobles positivas para RORC y CCR6 en presencia de VIP. A este respecto, tampoco se ha publicado ningún efecto. Yadav y colaboradores analizan la expresión de CCR6 en ratones *wild type* y ratones deficientes para la expresión de VPAC₂ en un modelo experimental de colitis sin encontrar modificaciones en la expresión de CCR6 en ningún caso (Yadav *et al.*, 2011).

Relativo a la función de VIP sobre **la capacidad potencial de migración de las células Th activadas *in vitro***, encontramos de nuevo que VIP mantiene tal capacidad presentada por las células Th *per se* tras la activación. En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que cerca de un 8% de las células son dobles positivas para RORC y CCR6. Aproximadamente un 50% de las células Th activadas *in vitro* son Th17 (expresan RORC) pero no presentan expresión del receptor de quimiocina. Dado que CCR6 es un marcador característico de las células Th17, lo esperable sería que todas las células Th17 expresasen CCR6. No obstante, se ha descrito que las células que expresan CCR6 se localizan fundamentalmente en las mucosas y en la piel (Schutyser *et al.*, 2003). De manera que, podría ser razonable que las células Th procedentes de sangre periférica muestren baja expresión de CCR6 ya que se encuentran en circulación y no vinculadas a un tejido específico. Por otra parte, no se observa ningún efecto significativo de VIP sobre la capacidad potencial de migración en respuesta a CCL20 de las células Th activadas *in vitro*.

En relación al **efecto de VIP sobre la capacidad potencial de migración de las células Th17 polarizadas *in vitro*** se concluye igualmente que VIP mantiene la capacidad que muestran estas células *per se*. Como era de esperar, el análisis de la expresión de CCR6 muestra un aumento significativo en su expresión en las células Th17 polarizadas respecto a las células activadas en condiciones no polarizantes (datos comparados, [Artículos 2 y 4](#)). Aproximadamente el 25% de las células son dobles positivas para RORC y CCR6. Por lo que, de nuevo, una fracción de las células RORC positivas no expresa CCR6. El análisis del efecto de VIP sobre este parámetro funcional no muestra diferencias en presencia o ausencia del péptido, al igual que en el caso previo. Aunque VIP induce un ligero incremento en el porcentaje de células dobles positivas para RORC y CCR6, éste no llega a ser significativo.

Una vez descrita la función de VIP sobre estos parámetros funcionales, nos centramos en el estudio del fenotipo patogénico/no patogénico de las células objeto de estudio, para posteriormente evaluar la modulación de VIP sobre el fenotipo funcional de tales células.

5. Efecto de VIP sobre la patogenicidad de las células Th17 humanas

En los últimos años se ha mostrado que las células Th17 presentan heterogeneidad funcional dependiendo de su perfil fenotípico. De manera que, en función del conjunto de citocinas producidas además de otros factores, se puede distinguir entre células Th17 patogénicas y no patogénicas

(Ghoreschi *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2011b; Sallusto *et al.*, 2012). Las células Th17 patogénicas se caracterizan principalmente por la producción de IL-22, GM-CSF, IL-2 e IFN γ , además de otras citocinas como IL-17 e IL-21 (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). Por su parte, las células Th17 no patogénicas expresan, conjuntamente con IL-17 e IL-21, las interleucinas IL-10 e IL-9 (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). Sumado a la expresión de un perfil de citocinas u otro, la presencia de determinados factores de transcripción se ha asociado con cada uno de los fenotipos Th17. En este sentido se ha descrito que el factor de transcripción T-bet está asociado al fenotipo patogénico (Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012), mientras que AhR se relaciona con el fenotipo no patogénico (Ghoreschi *et al.*, 2010). En base a estas publicaciones recientes, nos propusimos analizar el fenotipo patogénico/no patogénico de las células Th17 diferenciadas *in vitro* (Artículo 3), las células memoria Th activadas *in vitro* (Artículo 2) y las células Th17 polarizadas *in vitro* (Artículo 4), así como evaluar si VIP es capaz de modificar este perfil.

La presencia de un fenotipo u otro de células Th17 depende fundamentalmente de las citocinas presentes en el microambiente. La inducción del fenotipo patogénico tiene lugar principalmente en presencia de IL-23. Esta citocina se ha identificado como una citocina crucial para el desarrollo del proceso inflamatorio asociado a las células Th17 en patologías como EAE y CIA (Cua *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005; McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010). Los mecanismos en los que se basa la IL-23 para desencadenar la patología asociada a estas células son varios. Por una parte, induce sobre las células Th17 la expresión de marcadores asociados a patogenicidad, tales como GM-CSF, IFN γ , IL-22, IL-23R y T-bet (Langrish *et al.*, 2005; McGeachy *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Manel *et al.*, 2008; Ahern *et al.*, 2010; Ghoreschi *et al.*, 2010; Codarri *et al.*, 2011; El-Behi *et al.*, 2011). En el sentido contrario, la IL-23 inhibe la expresión de marcadores asociados al fenotipo no patogénico, como IL-10 e IL-9 (Elyaman *et al.*, 2009; Ahern *et al.*, 2010). Además de la IL-23, algunos trabajos han mostrado que la IL-1 β puede presentar un efecto inductor sobre el fenotipo patogénico puesto que promueve la expresión de IFN γ , IL-22 y GM-CSF (WIL-son *et al.*, 2007; El-Behi *et al.*, 2011) e inhibe la expresión de IL-10 (Zielinski *et al.*, 2012). Contrariamente, la principal citocina que modula la generación de las células Th17 no patogénicas es TGF β . Se ha descrito que las células Th17 que se diferencian en presencia de TGF β e IL-6 son la que presentan el fenotipo no patogénico, ya que no son capaces de desarrollar la respuesta inflamatoria patológica que tiene lugar en la EAE (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010). Las propiedades de TGF β para modular el fenotipo de las células Th17 hacia un fenotipo no patogénico son varias. En primer lugar, estimula la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-9 en las células Th17 (McGeachy *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Beriou *et al.*, 2010). En segundo lugar, TGF β presenta la facultad de inhibir la expresión de marcadores asociados a patogenicidad, como IL-22, GM-CSF, IL-23R y T-bet (McGeachy *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Volpe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a; Zhou *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2009; Ghoreschi *et al.*, 2010; El-Behi *et al.*, 2011). En nuestros estudios varias de estas citocinas moduladoras se emplearon tanto en la diferenciación como en la polarización de las células Th17. La presencia de citocinas como IL-23 o IL-1 β podría implicar la generación de células Th17 con fenotipo patogénico. En relación a la primera, cabe

mencionar que, a pesar de que su expresión se ha asociado a patogenicidad, la estabilización de la subpoblación Th17 requiere de la presencia de IL-23 (Aggarwal *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; McGeachy *et al.*, 2009). Así mismo, la expresión del receptor de esta citocina no es exclusiva de las células Th17 patogénicas, mientras que su sobre-expresión sí que está relacionada con la patogenicidad de las mismas (Ghoreschi *et al.*, 2011; Zúñiga *et al.*, 2013). De manera que podría considerarse que una presencia mínima de IL-23 es necesaria para sostener la diferenciación terminal de estas células, mientras que una sobre-expresión estaría relacionada con el fenotipo patogénico. Por otro lado, McGeachy y colaboradores han sugerido que en la diferenciación en la presencia de TGF β , IL-6 e IL-23, las dos primeras citocinas ejercen un efecto dominante sobre la IL-23 generando un fenotipo no patogénico (McGeachy *et al.*, 2007), lo que podría tener lugar en nuestros cultivos. En relación a la IL-1 β , aunque se ha relacionado con el fenotipo patogénico, esta citocina es necesaria para la diferenciación de las células Th17 (Sutton *et al.*, 2006a; Veldhoen *et al.*, 2006; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007b; Wilson *et al.*, 2007; Cosmi *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Además, similar a lo descrito para el caso de la IL-23, se ha mostrado que la IL-1 β sola induce la expresión de IFN γ en las células Th17, sin embargo en combinación con IL-6 y TGF β este efecto se pierde (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007b). De manera que, en nuestras condiciones de diferenciación o polarización, es posible que la presencia combinada de todas estas citocinas promueva la adquisición del fenotipo no patogénico gracias a la inhibición de las “funciones patogénicas” que individualmente ejercen algunas de las citocinas.

En relación al **efecto de VIP sobre el fenotipo patogénico/no patogénico de las células Th17 diferenciadas *in vitro***, concluimos que este neuropéptido mantiene el fenotipo no patogénico que presentan estas células *per se*. Inicialmente caracterizamos el fenotipo de las células Th17 tras la diferenciación *in vitro* observando que el fenotipo de estas células es no patogénico. En primer lugar, los resultados muestran que estas células producen menores niveles de IL-22 e IFN γ y mayores niveles de IL-9 que las células activadas en ausencia de condiciones de diferenciación Th17. Respecto a la IL-22 se ha publicado que esta citocina se encuentra asociada al fenotipo patogénico de las células Th17 (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012) y su producción se ha relacionado con el desarrollo de inflamación y patología (Zenewicz y Flavell, 2008), como por ejemplo la psoriasis (Zheng *et al.*, 2007). En la misma línea, la producción de IFN γ en las células Th17 se relaciona con su carácter patogénico, dada la implicación de esta citocina en los procesos inflamatorios (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). Por tanto, la menor producción de IL-22 e IFN γ en las células Th17 diferenciadas *in vitro* sugiere que el fenotipo de estas células es no patogénico, teniendo en cuenta los hallazgos previamente descritos (McGeachy *et al.*, 2007; Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012). Referente a la IL-9, aunque esta citocina se ha visto involucrada en procesos patológicos, también se ha descrito que presenta propiedades anti-inflamatorias. Sobre las células Th17, la expresión de IL-9 se ha relacionado con una menor patogenicidad ya que las células que producen esta citocina no desarrollan una respuesta inflamatoria patológica asociada a gastritis autoinmune, esclerosis múltiple o diabetes autoinmune (Elyaman *et al.*, 2009; Beriou *et al.*, 2010; Stephens *et al.*,

2011). De tal modo que, el aumento en la producción de esta citocina en las células Th17 diferenciadas en nuestros cultivos sugiere de nuevo un fenotipo no patogénico. Por otra parte, nuestros cultivos muestran que las células Th17 diferenciadas tienen la capacidad de producir IL-10 en niveles comparables a las células activadas en ausencia de condiciones de diferenciación. En este sentido, se ha descrito que las células Th17 también son capaces de producir IL-10 y ello se ha asociado con una posible función reguladora de estas células (McGeachy *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Ghoreschi *et al.*, 2010; Zúñiga *et al.*, 2013). Finalmente, en la misma línea que los resultados expuestos, los análisis de correlación muestran que existe una correlación negativa entre la expresión de RORC e IL-22 y de IL-2 e IL-17, mientras que la correlación es positiva entre la expresión de IL-9 e IL-17 y de IL-10 e IL-17. Apoyando nuestros resultados, esta correlación negativa entre RORC e IL-22 ya ha sido apuntada previamente (Ganjlikhani Hakemi *et al.*, 2011). En su conjunto, todas estas correlaciones apuntan a que, bajo nuestras condiciones de diferenciación, las células Th17 adquieren un fenotipo no patogénico. Por otra parte, nuestros resultados muestran que, de acuerdo a los resultados previamente publicados (Veldohen *et al.*, 2008b), las células Th17 diferenciadas presentan un incremento en la expresión de AhR, lo que señala también hacia un fenotipo no patogénico. Además, los resultados de este trabajo permiten observar que las células Th17 diferenciadas presentan un descenso en la expresión de T-bet. Dada la asociación de este factor de transcripción con el fenotipo patogénico de estas células (Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012), la expresión reducida del mismo de nuevo indica el carácter no patogénico de estas células. Por su parte, el análisis del efecto de VIP no muestra diferencias en presencia del péptido en cuanto a la expresión de las citocinas y los factores de transcripción, por lo que consideramos que este neuropéptido mantiene el fenotipo no patogénico testado en las células Th17 diferenciadas *in vitro*.

Referente al **efecto de VIP sobre el fenotipo patogénico/no patogénico de las células Th activadas *in vitro***, observamos que VIP inhibe el fenotipo patogénico de las células Th activadas *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que VIP causa una disminución en la producción de IL-22 y GM-CSF, una reducción en la expresión de IL-22, IL-2 y T-bet a nivel de mRNA, y un aumento en la producción de IL-9 en las células Th activadas *in vitro*. Aunque de forma indirecta, la inhibición mediada por VIP sobre la producción de IL-22 se ha descrito previamente sobre células Th murinas (Ding *et al.*, 2012), por lo que nuestros resultados concuerdan con lo esperado. En relación a GM-CSF, se ha mostrado que, no sólo promueve la activación y la generación de las células Th17 mediante la inducción de la secreción de citocinas como IL-23 e IL-6 en las DCs (Sonderegger *et al.*, 2008b), sino que su función es crucial en la patogenidad de estas células (Codarri *et al.*, 2011; El-Bethi *et al.*, 2011; McGeachy, 2011). Por su parte, el aumento en la expresión de IL-2 y T-bet se ha relacionado también con el fenotipo patogénico de las células Th17 (Ghoreschi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012).

Finalmente, relacionado con **el efecto de VIP sobre el fenotipo patogénico/no patogénico de las células Th17 polarizadas *in vitro***, concluimos VIP es capaz de aumentar el fenotipo no patogénico de estas células incrementando la expresión de citocinas con propiedades anti-inflamatorias. En primer lugar, los resultados obtenidos muestran que las células Th polarizadas *in vitro* hacia Th17

adquieren un fenotipo no patogénico ya que estas células producen mayores niveles de IL-9 y menores niveles de IL-22 y GM-CSF que las células activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Además, las células Th17 muestran la capacidad de expresar IL-10. Sin embargo, el nivel de IL-10 expresado en las células Th17 polarizadas en cultivo es menor que el de las células activadas en condiciones no polarizantes. En este sentido, la IL-10 puede ejercer su acción anti-inflamatoria de forma autocrina sobre las propias células Th17 dando lugar a un mecanismo de auto-regulación (McGeachy *et al.*, 2007), por lo que parece razonable que la secreción de esta citocina sea más reducida permitiendo así la adquisición de un fenotipo no patogénico pero evitando que niveles elevados de esta citocina consigan bloquear por completo la función de estas células. La conclusión obtenida de estos resultados concuerda con lo observado sobre las células diferenciadas *in vitro* ([Artículo 3](#)). Por su parte, el análisis del efecto de VIP sobre la expresión de marcadores asociados a patogenicidad/no patogenicidad en estas células muestra que el péptido induce la expresión de las citocinas IL-10 e IL-9. Sobre células Th17 humanas, este trabajo describe por primera vez el efecto inductor de VIP sobre la producción de estas citocinas. Previamente se ha descrito sobre linfocitos Th la función de VIP sobre la expresión de IL-10, mostrándose resultados opuestos (Martinez *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Voice *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2005a). Nuestros resultados sobre las células Th17 polarizadas *in vitro* revelan un efecto inductor del péptido sobre la expresión de esta citocina, lo que podría constituir un mecanismo inmunomodulador de VIP sobre la función de estas células promoviendo el fenotipo no patogénico o la propia auto-regulación.

Dada la estrecha relación entre la heterogeneidad funcional de las células Th17 y la posibilidad de adquirir características de otras subpoblaciones linfoides, el siguiente paso consiste en analizar el perfil Th17/1 de las células objeto del estudio, para subsiguientemente testar la regulación ejercida por VIP sobre este perfil.

6. Efecto de VIP sobre el perfil Th17/1 de las células Th humanas

Una característica destacada de la subpoblación Th17 es la gran plasticidad fenotípica en comparación con otras células Th. Estas células pueden adquirir características de otros subconjuntos o incluso re-diferenciarse hacia otras subpoblaciones dependiendo del microambiente circundante. En este sentido, la capacidad de las células Th17 de adquirir un perfil de tipo Th1 se ha descrito ampliamente, asociándola con la patogenicidad de estas células. Este proceso puede estudiarse analizando la expresión de marcadores de ambos subtipos celulares, ya que las células Th17 muestran una progresiva pérdida de la expresión de IL-17, ROR γ t y ROR α , a la vez que un aumento de la expresión de T-bet e IFN γ (Annunziato *et al.*, 2007; Bending *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Kruschus *et al.*, 2010). Este cambio progresivo permite que se genere un fenotipo intermedio Th17/1, caracterizado por la co-expresión de IL-17 e IFN γ , así como ROR γ t y T-bet (Lexberg *et al.*, 2010; Maggi *et al.*, 2012). Dada la importancia de este fenómeno, nos planteamos caracterizar el fenotipo asociado a Th1 de las células Th17 diferenciadas *in vitro* ([Artículo 3](#)), las células memoria Th activadas *in vitro* ([Artículo 2](#)) y

las células Th17 polarizadas *in vitro* ([Artículo 4](#)), así como evaluar si VIP es capaz de modificar este perfil Th17/1.

Se ha descrito que la conversión de las células Th17 hacia un fenotipo Th1 está regulada por la presencia de diversas citocinas, entre las cuales destaca la función de la IL-12 como citocina inductora. Sin embargo otras citocinas también pueden estar involucradas como IL-23, IFN γ o TNF α . Contrariamente, TGF β modula negativamente este proceso. En paralelo a la situación descrita en el *Apartado 5*, la presencia de IL-23 en el medio de diferenciación o polarización *in vitro* de las células Th17 podría llevar a pensar en la inducción de la adquisición de un perfil de tipo Th1 en tales condiciones experimentales. Sin embargo la presencia de TGF β puede ser capaz de impedir este proceso ya que esta citocina inhibe la expresión de T-bet e IFN γ (Ghoreschi *et al.*, 2011; Zúñiga *et al.*, 2013). Aún más, se ha descrito que TGF β inhibe la transición inducida por IL-23 (Lee *et al.*, 2009). De tal modo que, las citocinas empleadas en el medio de diferenciación o polarización no deberían implicar la adquisición de características propias de la subpoblación Th1 sobre las células Th17 diferenciadas o polarizadas *in vitro*. Por otra parte, podría considerarse que la expresión de moléculas relacionadas con las células Th1, no provenga de las células Th17 sino de la presencia de células Th1 propiamente dichas. Sin embargo, en los cultivos de diferenciación prácticamente descartamos esta posibilidad puesto que partimos de células naïve que son diferenciadas hacia Th17. Cabe recordar aquí, que en el medio de diferenciación/polarización se emplea el anticuerpo frente a IL-12p35, por lo que no se promueve el desarrollo de linfocitos Th1.

En relación al **efecto de VIP sobre el perfil Th17/1 de las células Th17 diferenciadas *in vitro***, los análisis revelan que VIP presenta un efecto negativo sobre la adquisición de un perfil Th17/1 en las células Th17 diferenciadas *in vitro*. En primer lugar, caracterizamos dicho perfil en las células Th17 una vez diferenciadas y observamos que estas células Th17 no adquieren un fenotipo relacionado con la subpoblación Th1, ya que tras la diferenciación las células Th17 presentan menor expresión de T-bet e IL-12R β 2 y una menor producción de IFN γ que las células activadas en ausencia de condiciones de diferenciación. Además, el porcentaje de células co-expresoras de RORC y T-bet es muy bajo. A pesar de esta escasa expresión de los marcadores característicos de células Th1, nos preguntamos si VIP sería capaz de inhibir la posible adquisición de un fenotipo Th17/1. Los resultados obtenidos muestran que el pequeño porcentaje de células dobles positivas para RORC y T-bet es aún menor en la presencia del neuropéptido. Un resultado similar ha sido publicado por Ding y colaboradores, los cuales encuentran también una modesta reducción en el porcentaje de células co-expresoras de IL-17 e IFN γ en presencia de VIP (Ding *et al.*, 2012). Además, en nuestro estudio, cuando VIP está presente en el cultivo las correlaciones entre la expresión de IFN γ e IL-17 y entre T-bet y RORC son negativas en las células Th17. Estos hallazgos indican que, la escasa tendencia de las células Th17 hacia la adquisición de un fenotipo Th1, mostrada por las correlaciones positivas, es abolida en la presencia de VIP.

Referente al **efecto de VIP sobre el perfil Th17/1 de las células Th activadas *in vitro***, concluimos que VIP modula negativamente el perfil Th17/1 sobre estas células. Previamente determinamos cuál de las dos poblaciones, Th17 o Th1, es mayoritaria tras la activación de las células Th. Los resultados muestran que la población mayoritaria es de tipo Th17, la cual es más abundante que la subpoblación Th1 puesto que el porcentaje total de células que expresan RORC es mayor que el de células que expresan T-bet y las primeras proliferan más que estas últimas. Estos análisis muestran también un pequeño porcentaje de las células doble positivas para RORC y T-bet. Teniendo en cuenta estos hallazgos, evaluamos si VIP sería capaz de modular este fenotipo Th17/1, observando en primer lugar que, VIP inhibe la expresión de T-bet (como se menciona en el *Apartado 5, Discusión*) e IL-12R β 2. Además, la correlación entre los factores de transcripción RORC y T-bet, que es positiva en ausencia de VIP, se convierte en negativa cuando el péptido está presente en el cultivo. Todo ello indica que VIP inhibe la adquisición del perfil Th17/1, lo que apoya aún más los resultados previos (*Apartado 5, Discusión*), puesto que este perfil se asocia a patogenicidad.

En relación al **efecto de VIP sobre el perfil Th17/1 de las células Th17 polarizadas *in vitro***, se observa un efecto negativo del péptido sobre la adquisición de un perfil de tipo Th1 en estas células. De nuevo antes de evaluar el efecto de VIP, determinamos la posible adquisición de un perfil Th17/1 durante la polarización *in vitro* de las células Th17, observando que las células Th17 polarizadas bajo nuestras condiciones de experimentación presentan una baja adquisición de marcadores Th1. Tras la polarización se observa que las células presentan menor expresión de IFN γ , IL-12R β 2 y T-bet que las células activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, *Artículos 2 y 4*). Este hallazgo discurre en paralelo a lo observado en el caso de las células Th17 diferenciadas *in vitro* (*Artículo 3*). Seguidamente, evaluamos el efecto de VIP sobre el mismo y advertimos que, mientras no existe correlación entre T-bet y RORC en las células Th17, esta correlación es negativa en presencia de VIP, indicando un efecto negativo del péptido sobre la adquisición del perfil Th17/1. Comparado con el efecto observado en el caso de las células Th17 diferenciadas, parece que el efecto de VIP sobre las células Th17 polarizadas *in vitro* es menor. Ello podría deberse a una menor expresión de sus receptores en las células memoria polarizadas respecto a las células diferenciadas *in vitro*. Como se describe en el *Apartado 3*, la expresión de VPAC₂ es menor en las células Th17 polarizadas que en las diferenciadas. Lo mismo ocurre para el caso de VPAC₁ (análisis comparado, *Artículos 3 y 4*). Sin embargo, otra cuestión importante que puede dar lugar a este menor efecto de VIP es que las células de partida en un caso u otro son muy diferentes. En este estudio el cultivo se inicia con un conjunto de células Th memoria, en donde se espera que se expresen marcadores de tipo Th1, mientras que en el estudio previo el cultivo se inicia con células naïve. De manera que el efecto de VIP podría verse en cierto modo enmascarado por una mayor presencia de partida de marcadores asociados a Th1.

Contrariamente a la asociación entre el perfil Th17/1 y la patogenicidad de las células Th17, la adquisición de un fenotipo regulador en tales células podría inhibir su patogenicidad. La posibilidad de que VIP sea capaz de modular negativamente el primero y positivamente el segundo constituiría un mecanismo inmunomodulador muy completo sobre este tipo celular. Por ello, el siguiente punto

analiza el posible efecto de VIP sobre la adquisición de un perfil Th17/Treg por parte de las células Th17 polarizadas *in vitro*.

7. Efecto de VIP sobre el fenotipo Th17/Treg de las células Th17 humanas

Con anterioridad se describe la capacidad de los linfocitos Th17 para adquirir un perfil asociado a la subpoblación Th1, sin embargo las células Th17 pueden adquirir características de otras subpoblaciones, como Th2 o Tfh. Aunque existen pocos datos al respecto, se ha descrito también que los linfocitos Th17 pueden adquirir un fenotipo T regulador (Hoechst *et al.*, 2011; Obermajer *et al.*, 2014). Potencialmente, las células Th17 que adoptan este fenotipo pueden expresar marcadores asociados a ambas subpoblaciones, por lo que este fenómeno puede ser estudiado analizando la expresión de los factores de transcripción y las citocinas principales de cada una de las subpoblaciones. La posibilidad de que las células Th17, caracterizadas como pro-inflamatorias, pudiesen adquirir un fenotipo regulador, es de gran relevancia. Por ello, quisimos analizar si este fenotipo puede presentarse en las células Th17 polarizadas *in vitro*, así como si la presencia de VIP durante la polarización es capaz de modularlo (Artículo 4).

Los resultados del estudio sugieren que VIP podría promover la adquisición de un fenotipo relacionado con la subpoblación Treg en las células Th17 polarizadas *in vitro*. En primer lugar, observamos que las células Th17 no presentan marcadores asociados a células Treg, ya que tras la polarización las células muestran menor expresión de Foxp3 e IL-10, así como una menor producción de esta citocina que las activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, Artículo 2 y 4). El análisis del efecto de VIP muestra que, por una parte, VIP produce un incremento en la producción de IL-10 y, por otra parte, la correlación entre Foxp3 y RORC, que no existe en las células Th17, es positiva en presencia del péptido. Todo ello sugiere un posible efecto modulador positivo de VIP sobre la adquisición de un perfil relacionado con la subpoblación Treg. Este aparente efecto concurriría con el hecho de que VIP promueve el no patogénico de las células Th17 polarizadas *in vitro*. No obstante, se trata únicamente de un apunte inicial, puesto que serían necesarios más estudios, tales como el análisis de co-expresión de RORC y Foxp3 para profundizar en este sentido. De hecho, los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden sugerir que durante el cultivo las células Th17 adquieren un fenotipo Treg o que las células Treg adoptan un fenotipo Th17. En este sentido, se ha descrito también que las células Treg pueden re-diferenciarse y adquirir un fenotipo de tipo Th17. Varias citocinas, tales como la IL-6 o la IL-1 β principalmente, pero también la IL-23 y la IL-21, pueden favorecer este proceso. El fenotipo proveniente del proceso de re-diferenciación presenta características de ambos subconjuntos, de manera que las células Th17 derivadas de Treg co-expresan Foxp3 y ROR γ t (Osorio *et al.*, 2008; Ayyoub *et al.*, 2009; Voo *et al.*, 2009). Dado que en nuestro trabajo de polarización partimos de una población total de linfocitos Th que se activan y expanden en condiciones favorecedoras del subtipo Th17, es posible que en tales condiciones las células Treg que inicialmente se encuentran en el cultivo puedan verse influenciadas para re-diferenciarse hacia células Th17.

8. Efecto de VIP sobre la activación *in vivo* de los linfocitos Th en el modelo de diabetes experimental NOD

Numerosas patologías de tipo inflamatorio y/o autoinmune presentan una fuerte implicación de los linfocitos Th. La T1D es un ejemplo claro de ello, puesto que en ella las células Th participan activamente en el proceso inflamatorio que desencadena la destrucción de los islotes pancreáticos. En este sentido, la capacidad de VIP de modular la función T colaboradora puede convertirlo en un candidato potencial para el tratamiento de los pacientes diabéticos. De hecho, en diabetes experimental se ha demostrado la eficacia del péptido inhibiendo la respuesta inflamatoria pancreática. Varios trabajos han mostrado que VIP reduce el desarrollo de la insulitis y la aparición de la diabetes en ratones NOD (Herrera *et al.*, 2006; Rosignoli *et al.*, 2006). Tales estudios muestran el efecto de VIP sobre algunas de las subpoblaciones linfoides Th en momentos concretos de la enfermedad. Sin embargo, en nuestro estudio realizamos un análisis completo del efecto de VIP sobre las distintas subpoblaciones a lo largo del desarrollo de la enfermedad en los ratones NOD ([Artículo 5](#)). Además, anteriormente no se ha estudiado la función del péptido sobre la subpoblación Th17 en tales ratones, de modo que este es el primer trabajo en el que se describe tal modulación.

En primer lugar, analizamos el **efecto de VIP sobre la subpoblación Th17** y observamos que VIP inhibe *in vivo* la respuesta funcional de las células Th17 durante los estadios finales de la enfermedad en los ratones NOD. Los resultados muestran que el perfil de expresión pancreática de IL-17, IL-22, IL-23, IL-17R e IL-23R en los ratones NOD a lo largo de las semanas es muy similar, mostrando un aumento gradual en la expresión hasta la semana 20, momento en el cual comienza la diabetes *per se*, a partir de la cual la expresión declina. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de esta subpoblación en el desarrollo patológico de la diabetes. Por tanto, se encuentran en concordancia con datos previos obtenidos en diferentes modelos experimentales de T1D en los que se ha observado un aumento en el número de células Th17 o en la expresión pancreática y sérica de la IL-17 (Vukkadapu *et al.*, 2005; Martin-Orozco *et al.*, 2009; van den Brandt *et al.*, 2010; Yaochite *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Por otra parte, nuestros resultados permiten observar que el tratamiento de los ratones diabéticos con VIP decrece la expresión de IL-22 en la semana 20 y de IL-17 en la semana 25. Estos resultados concuerdan con los hallados en los ratones sanos, en los que se observa una inhibición funcional de la subpoblación Th17 en presencia de VIP ([Artículo 1](#)).

Así mismo, estudiamos el **efecto de VIP sobre la subpoblación Treg** encontrando que VIP promueve *in vivo* la respuesta T reguladora en los ratones diabéticos. Los resultados muestran que el porcentaje de células dobles positivas para CD4 y CD25 en el bazo de los ratones diabéticos disminuye durante el curso de la enfermedad. El defecto cuantitativo o cualitativo en las células Treg relacionado con la diabetes se ha sugerido en varios trabajos, pero los resultados al respecto no son unánimes. En diversos modelos experimentales se ha observado que estas células presentan capacidad supresora y su transferencia puede inhibir la aparición de inflamación pancreática (Sakaguchi *et al.*, 1995; Lepault y Gagnerault, 2000; Szanya *et al.*, 2002; Alyanakian *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004;

Masteller *et al.*, 2005; You *et al.*, 2005; Tarbell *et al.*, 2007). Sin embargo, otros trabajos muestran una función Treg disminuida en los ratones NOD (Gregg *et al.*, 2004; You *et al.*, 2005; Mellanby *et al.*, 2007; Tritt *et al.*, 2008). A pesar de que estos estudios apuntan más hacia un fallo cualitativo en lugar de una reducción en el número de las células Treg, nuestros resultados sugieren que existe también una disminución cuantitativa durante el desarrollo de la enfermedad en los ratones NOD. Contrariamente, en los ratones tratados con VIP el porcentaje de células dobles positivas para CD4 y CD25 está aumentado en las semanas 20 y 30 de edad. Este dato indica que el péptido promueve la función T reguladora en estos ratones, lo que concuerda con lo anteriormente descrito (Rosignoli *et al.*, 2006). Así, VIP puede originar una respuesta beneficiosa en la patogenia de la enfermedad.

Anteriormente se describe la importancia del estudio de los balances entre las diferentes subpoblaciones Th activadas *in vitro*. En estudios *in vivo*, el análisis de los balances no sólo puede ser interesante por la cualidad heterogénica y plástica de los linfocitos Th, sino porque además en estos modelos no existen poblaciones Th aisladas, sino que todas las subpoblaciones pueden encontrarse actuando de forma conjunta. Por ello, evaluamos la función inmunomoduladora de VIP sobre los balances entre los diferentes subconjuntos en los ratones NOD.

En primer lugar, caracterizamos la **función de VIP sobre el balance Th17/Th1**, observando que VIP es capaz de modular *in vivo* este balance favoreciendo la respuesta Th17 sobre la respuesta de tipo Th1 en los ratones diabéticos. Previo al análisis del efecto de VIP determinamos este balance en los ratones NOD, el cual no ha sido previamente descrito, encontrando que durante el desarrollo de la diabetes se produce una progresiva pérdida de la respuesta Th17 en favor de una respuesta de tipo Th1. Los resultados muestran que, en general, el ratio entre la expresión de los factores de transcripción de ambas subpoblaciones decrece en el páncreas y el bazo de los ratones NOD de forma progresiva desde el comienzo de la enfermedad. Igualmente, el ratio entre IL-23 e IL-12 decrece a partir de la semana 10 en el páncreas de los ratones NOD. Como se describe anteriormente, ambas subpoblaciones se han relacionado con el desarrollo de la T1D en los ratones NOD. No obstante, a pesar de la función descrita para las células Th17, algunos autores han propuesto que la conversión de las células Th17 en células con fenotipo Th1 está involucrada en el proceso patológico en la diabetes (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009). Estos trabajos muestran que las células Th17 generan diabetes únicamente si se convierten en células productoras de IFN γ . En este sentido, la disminución progresiva del ratio durante el progreso de la enfermedad podría reflejar la conversión de los linfocitos Th17 en células Th1 en los ratones NOD. Dado que tal conversión se asocia con la patogenicidad de las células Th, la posible modulación de VIP sobre el balance entre estas subpoblaciones podría constituir un mecanismo beneficioso en estos ratones. El análisis del efecto de VIP muestra que este neuropéptido es capaz de incrementar el ratio ROR γ t/T-bet en la semana 20 en el páncreas y a lo largo de todo el desarrollo de la enfermedad en el bazo, el ratio entre IL-17 e IFN γ en la semana 15 en el bazo, y el ratio entre IL-23 e IL-12 en las semanas 20 y 25 así como el balance entre los receptores de ambas citocinas en las semanas 10 y 15 de edad en el páncreas de los ratones NOD. Estos hallazgos indican que VIP incrementa el balance Th17/Th1 en los ratones diabéticos, lo que se

relaciona con lo observado en los ratones sanos ([Artículo 1](#)). El efecto de VIP aumentando el ratio entre la subpoblación Th17 sobre el subconjunto Th1 podría reflejar una inhibición del proceso de conversión de los linfocitos Th17 en Th1. La realización de estudios de plasticidad sería muy interesante para esclarecer estas cuestiones, las cuales simplemente pueden ser apuntadas a partir de los datos de este trabajo.

En segundo lugar caracterizamos el **efecto de VIP sobre balance entre la subpoblación Treg y las células Th17** y advertimos que VIP promueve *in vivo* la función T reguladora sobre la función Th17 efectora en los ratones NOD. Los resultados indican la existencia de balances elevados entre la expresión de TGF β e IL-6 en las semanas 20 y 25 en el páncreas, entre IL-27 e IL-23 en las semanas 10, 15 y 25 en el páncreas, entre Foxp3/ROR γ t en la semana 25 y en la semana 15 en el páncreas y el bazo respectivamente, y entre IL-10 e IL-17 en la semana 10 en el páncreas de los ratones NOD. Teniendo en cuenta los ratios entre las citocinas inductoras y los factores de transcripción puede observarse que la promoción de la respuesta de tipo Treg sobre la de tipo Th17 se produce fundamentalmente en la semana 25, momento en el cual la diabetes manifiesta ya se ha producido. Es posible que esta promoción de la función Treg pueda constituir un mecanismo que intente frenar el avance del proceso destructivo pancreático, el cual sin embargo no consigue revertir el desarrollo de la diabetes. De hecho el balance entre las citocinas IL-10 e IL-17 disminuye a partir de la semana 10, lo que sugiere un descenso en la funcionalidad de las células Treg. A este respecto, un modulador que consiga promover esta función Treg sobre la función de tipo Th17 en los estadios iniciales del desarrollo patológico podría dar lugar a un efecto beneficioso. En este sentido, en nuestro estudio el tratamiento de los ratones NOD con VIP consigue aumentar en el páncreas el ratio Foxp3/ROR γ t y TGF β /IL-6 en las semanas 10, 15 y 25 y en el ratio entre los factores de transcripción en la semana 25 en el bazo de los ratones tratados con VIP. Además conduce a un incremento en el páncreas en el ratio IL-10/IL-17 en la semana 20 y 25, por lo que a nivel funcional también se produce un aumento del balance Treg/Th17. En suma, en este trabajo se muestra por primera vez que *in vivo* VIP es capaz de modular positivamente el ratio Treg/Th17 en los ratones NOD. Este hallazgo se relaciona con lo anteriormente descrito en los ratones sanos ([Artículo 1](#)).

Finalmente, evaluamos el **efecto de VIP sobre el balance Th1/Th2** y observamos que este neuropéptido incrementa *in vivo* la función Th2 sobre la función Th1 en los ratones diabéticos. Los resultados muestran que el ratio entre los factores de transcripción de ambas subpoblaciones se encuentra más elevado en las semanas 10 y 15 y disminuye en las semanas 20 y 25 en los ratones NOD en el páncreas, mientras que en el bazo ocurre lo contrario. En relación a este balance se ha mostrado que el desarrollo de la enfermedad se asocia a un aumento de la función de tipo Th1 sumado a una disminución de la función Th2 (Huang *et al.*, 1995; Berman *et al.*, 1996; Koarada *et al.*, 2002). El análisis de la función de VIP sobre estas células muestra en primer lugar que VIP disminuye la expresión pancreática de T-bet en las semanas 10, 15 y 25, y en la semana 25 en el bazo, similar a lo observado previamente (Rosignoli *et al.*, 2006). Sobre la población Th2, VIP induce un aumento en la expresión pancreática de GATA3 en las semanas 10 y 15, de acuerdo con lo publicado anteriormente (Rosignoli

et al., 2006). Sobre el ratio entre ambas subpoblaciones, VIP induce un descenso en el ratio entre los factores de transcripción en el bazo y el páncreas de los ratones NOD en las semanas 10, 15 y 25, indicando que VIP disminuye la función Th1 en favor de la función Th2 en los ratones NOD, lo cual se ha sugerido previamente (Rosignoli *et al.*, 2006).

En resumen, los resultados observados en los ratones NOD tratados con VIP amplían el conocimiento previo acerca del efecto beneficioso *in vivo* del péptido sobre ratones NOD, poniendo de manifiesto los mecanismos protectores de VIP en relación con las subpoblaciones Th. La capacidad para modular las diferentes subpoblaciones Th podría tener lugar también en pacientes diabéticos, por lo que nuestros hallazgos insinúan que este neuropéptido podría ser candidato idóneo para el tratamiento de pacientes con T1D.

9. Efecto de VIP sobre los linfocitos Th17 procedentes de pacientes con artritis reumatoide

La asociación entre la subpoblación Th17 y el desarrollo de patología en la AR se ha documentado ampliamente, tanto en modelos animales como en pacientes artríticos. La potencial capacidad de VIP para inhibir esta respuesta en individuos artríticos lo convierte en un posible agente terapéutico en el tratamiento de esta enfermedad. De hecho, aunque no se ha estudiado la función concreta de VIP sobre esta subpoblación en relación a la artritis, si se ha descrito su efecto beneficioso en numerosos trabajos. Tal efecto abarca la inhibición de la inflamación, la destrucción del cartílago, así como de la erosión del hueso. En modelos experimentales se ha demostrado que el tratamiento con VIP es capaz de retrasar el comienzo de la enfermedad, así como disminuir la incidencia y la severidad de la sintomatología (Delgado *et al.*, 2001; Zafirova *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008b; Delgado *et al.*, 2008a; Deng *et al.*, 2010). Sobre pacientes artríticos, estudios *in vitro* han mostrado múltiples efectos de VIP que involucran distintos tipos celulares. Específicamente, sobre linfocitos Th, se ha observado que VIP inhibe la respuesta de los linfocitos Th1, regula el equilibrio Th1/Th2 y promueve la respuesta de tipo Treg en artritis experimental (Delgado *et al.*, 2001; Zafirova *et al.*, 2004; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2008b; Delgado *et al.*, 2008a; Deng *et al.*, 2010). Además, sobre muestras procedentes de pacientes con AR también se ha descrito que regula el equilibrio entre las poblaciones Th1 y Th2 (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos evaluar el **efecto de VIP sobre la activación *in vitro* de linfocitos Th procedentes de pacientes con AR** poniendo especial hincapié en la subpoblación Th17 (Artículo 2). Para llevar a cabo nuestro estudio seleccionamos pacientes con AR de reciente comienzo que aún no han recibido tratamiento, evitando así que la administración de los diversos tratamientos pueda interferir con nuestro estudio. Este hecho es muy importante dado que la interferencia con los distintos tratamientos, junto con las diferencias en la fase de la enfermedad de los pacientes empleados en los estudios, ha sido propuesta como una de las explicaciones en las numerosas discrepancias obtenidas en el estudio de las células Th17 en la AR.

Primeramente testamos la presencia de linfocitos Th17 tras la activación *in vitro* y observamos que las células Th activadas procedentes de pacientes con AR de reciente comienzo muestran una

mayor respuesta de tipo Th17 que las de los donantes sanos. Los resultados muestran un aumento del porcentaje de células que co-expresan RORC y CCR6 y un ligero incremento, aunque no significativo, en el porcentaje de células que expresan RORC. En relación a la frecuencia de las células Th17 procedentes de pacientes se han encontrado resultados contradictorios. Algunos investigadores observan un incremento en el porcentaje de estos linfocitos en sangre periférica de los pacientes con AR (Shen *et al.*, 2009; Colin *et al.*, 2010; Leipe *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011c; van Hamburg *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a), mientras que otros no confirman este hallazgo (Jandus *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2008; Arroyo-VIL-la *et al.*, 2012; Henriques *et al.*, 2013). Nuestros resultados apuntan sin embargo hacia un incremento en este porcentaje tras la activación de los linfocitos procedentes de sangre periférica. No obstante, se ha apuntado que la habilidad funcional de las células Th17 es más importante que su frecuencia en sangre periférica (Yamada *et al.*, 2008; Henriques *et al.*, 2013). En este sentido, en nuestro estudio se observa que las células Th de los pacientes artríticos muestran un incremento en la producción de IL-17, lo que apunta hacia un aumento de la respuesta Th17 en los pacientes. Este resultado se encuentra en consonancia con trabajos previamente publicados en los que se muestra un aumento de los niveles de IL-17 en el suero de los pacientes (Chen *et al.*, 2011c; Chen *et al.*, 2012), a pesar de que otros investigadores no encuentran diferencias o incluso observan una disminución de estos niveles (Leipe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Arroyo-VIL-la *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a). Aún más relacionado con nuestro estudio, tres trabajos muestran que tras la activación *in vitro* en condiciones no polarizantes de células Th procedentes de pacientes con AR temprana, se produce un aumento en los niveles de IL-17 en los sobrenadantes del cultivo (Colin *et al.*, 2010; Leipe *et al.*, 2010; van Hamburg *et al.*, 2011). Por otra parte, en nuestro trabajo se observa también que las células Th activadas *in vitro* presentan un aumento en la expresión a nivel de mRNA de IL-17, RORC, RORA y STAT3, aunque la expresión de IL-23R es menor, comparado con las células de los donantes sanos. En concordancia con nuestros resultados, se ha publicado también un aumento en pacientes artríticos de la expresión génica de IL-17 (Kohno *et al.*, 2008; van Hamburg *et al.*, 2011) y de RORC (Leipe *et al.*, 2010; van Hamburg *et al.*, 2011). En relación a la expresión de IL-23R dos trabajos han mostrado un aumento en los niveles de este receptor en los pacientes, pero en ninguno de los dos casos éste fue significativo (Shen *et al.*, 2009; van Hamburg *et al.*, 2011).

Conocida la respuesta mayoritaria de tipo Th17 en los pacientes, evaluamos la capacidad de VIP para modular dicha respuesta sobre el conjunto de células Th activadas *in vitro* y observamos que aparentemente VIP ejerce un efecto inhibitorio sobre la misma. Previo al análisis del efecto del péptido, primeramente caracterizamos la expresión de VPAC₁ y VPAC₂ en estas células. Los resultados muestran que las células Th activadas *in vitro* procedentes de los pacientes presentan ambos receptores, siendo la expresión de VPAC₁ mayor que la de VPAC₂. La expresión de los receptores se ha observado previamente en las articulaciones de los ratones artríticos (Delgado *et al.*, 2008b), así como en los FLS de pacientes con AR (Takeba *et al.*, 1999; Juarranz *et al.*, 2008). Además, se ha determinado la expresión de VPAC₁ sobre PBMCs procedentes de pacientes artríticos (Delgado *et al.*,

2008a). Sin embargo, éste es el primer trabajo que muestra la expresión de los receptores de VIP específicamente en linfocitos Th activados *in vitro* procedentes de pacientes con AR. Comparado con las células de los donantes sanos, las células procedentes de los pacientes muestran una menor expresión individual de ambos receptores. En este sentido, la disminución en la expresión de VPAC₁ en PBMCs activados procedentes de pacientes artríticos comparado con controles sanos se ha descrito previamente (Delgado *et al.*, 2008b), por lo que nuestros resultados concuerdan con lo esperado. Sin embargo el ratio VPAC₂/VPAC₁ es mayor en los pacientes. Este dato indica que el patrón de expresión de los receptores es distinto en las células Th activadas *in vitro* procedentes de los pacientes comprado con los controles sanos. Una vez analizada la expresión de los receptores, caracterizamos la función de VIP en las células Th procedentes de los pacientes encontrando un efecto inhibitor sobre la respuesta de tipo Th17. La presencia del neuropéptido durante la activación *in vitro* conduce a una disminución en la expresión de IL-21 y STAT3. Aunque no son exclusivos de esta subpoblación, ambos marcadores se asocian a células Th17, de manera que su inhibición mediada por VIP parece indicar que el péptido ejerce un efecto inhibitor sobre estas células. En concordancia con este hallazgo, trabajos previos *in vivo* en el modelo experimental de artritis CIA han mostrado que la administración de VIP ejerce un efecto inhibitor sobre la respuesta Th17 en los ratones artríticos (Juarranz *et al.*, 2005; Leceta *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2010). Por tanto, los resultados sugieren que en los pacientes con AR temprana, VIP exhibe un efecto inhibitor sobre la respuesta Th17 sobre el conjunto de linfocitos Th activados *in vitro*.

El proceso de re-diferenciación linfoide se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes, aunque no está claro si ello contribuye a la patogénesis o a la resolución de la enfermedad. En este tipo de enfermedades, el proceso de polarización puede verse favorecido ya que la respuesta inflamatoria desencadenada genera la creación de un microambiente inflamatorio cargado de citocinas que pueden influir sobre el fenotipo de los linfocitos Th reclutados al lugar de la inflamación. En este sentido, el microambiente inflamatorio que se desencadena en las articulaciones inflamadas de los pacientes con AR, puede construir un microambiente inductor de la subpoblación Th17. Se ha descrito que el ambiente local de citocinas generado en las articulaciones inflamadas contiene niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IL-23, las cuales promueven el desarrollo y la expansión de las células Th17 (Dong y Zhu, 2012). De manera que, es posible que bajo estas condiciones, el proceso de polarización hacia este subtipo celular se vea incrementado. En esta línea, la posibilidad de modular negativamente la adquisición de un fenotipo Th17 podría constituir un mecanismo beneficioso en el marco de la AR. Por ello, evaluamos el **efecto de VIP en los pacientes artríticos sobre la polarización *in vitro* de las células memoria Th hacia el subtipo Th17** (Artículo 4).

Primeramente analizamos el proceso de polarización *in vitro* de linfocitos memoria Th hacia la subpoblación Th17 partiendo de linfocitos procedentes de pacientes con AR, comparándolo con el caso de individuos sanos. Los resultados muestran que, bajo nuestras condiciones de experimentación, las células memoria Th polarizan hacia el fenotipo Th17 eficazmente ya que tras siete días de cultivo

se observa un aumento en la producción de IL-17 e IL-21, mientras que los niveles de otras citocinas, como IL-22, GM-CSF o IL-10, no se modifican o disminuyen. Así mismo, se observa un aumento en la expresión de RORC, RORA e IL-23R (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Comprado con los donantes sanos, las células memoria Th de pacientes artríticos presentan una mayor respuesta Th17. A esta conclusión se puede llegar gracias a que las células procedentes de los pacientes manifiestan un mayor porcentaje de células expresas de RORC, las cuales además proliferan más, así como una mayor producción de IL-17 y una mayor expresión de RORC, RORA y STAT3. En este sentido, Leipe y colaboradores han publicado un estudio que, aunque diferente, muestra similitudes con nuestros hallazgos (Leipe *et al.*, 2010). En su trabajo, los autores promueven la diferenciación de células naïve hacia Th17 en diferentes condiciones de cultivo y observan que, independientemente de las condiciones (solamente activación y activación junto con diferentes citocinas), las células de los pacientes presentan una mayor capacidad para diferenciarse hacia células Th17. Los autores sugieren que células de los pacientes muestran un potencial intrínseco anormal para diferenciarse hacia células Th17. Esta propuesta parece de acorde con los datos observados en nuestro estudio en células Th memoria. De manera que, el aumento en la respuesta Th17 encontrado en nuestro estudio podría ser debido a una mayor capacidad de polarización de los linfocitos Th hacia este subtipo. No obstante, la mayor presencia de células Th17 al inicio del cultivo en los pacientes podría ser la causa de la mayor expansión de estas células. En este sentido, numerosas investigaciones han mostrado que los pacientes con AR presentan niveles elevados de células Th17 en sangre periférica (Shen *et al.*, 2009; Colin *et al.*, 2010; Leipe *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011c; van Hamburg *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012a). Aun así, independientemente de la causa, la consecuencia final en nuestro estudio es que las células de los pacientes con AR, cuando las condiciones microambientales son favorables, presentan una mayor respuesta de tipo Th17.

Conocida la presencia principal de las células Th17 en los pacientes, caracterizamos el efecto de VIP sobre la polarización *in vitro* de las células Th17 procedentes de pacientes, y observamos que aparentemente VIP promueve la respuesta Th17 en los pacientes con AR temprana. Para llevar a cabo nuestro objetivo, en primer lugar caracterizamos la expresión de los receptores de VIP encontrando que las células Th17 polarizadas *in vitro* presentan mayor expresión individual de VPAC₁ y de VPAC₂ que las células activadas en condiciones no polarizantes, pero sin embargo el ratio VPAC₂/VPAC₁ es similar en ambos tipos de células (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Cuando comparamos la expresión de los receptores en las células Th17 polarizadas *in vitro* en pacientes y en donantes sanos se observa que el ratio VPAC₂/VPAC₁ es mayor en las células procedentes de los pacientes. Este dato sugiere una presencia destacada de VPAC₂ en el marco de la AR. En este sentido, a pesar de ser otro tipo celular, se ha descrito que los FLS procedentes de pacientes con AR presentan una mayor expresión de VPAC₂ que de VPAC₁ (Takeba *et al.*, 1999; Juarranz *et al.*, 2008), lo que podría estar relacionado con los hallazgos encontrados en este trabajo. Tras identificar la expresión de los receptores de VIP en las células procedentes de los pacientes, evaluamos el efecto del péptido sobre las mismas encontrando que VIP induce un aumento de la expresión de IL-17 y RORC en las células Th.

Sin embargo, este efecto en la expresión de IL-17 no se traduce en un aumento de la producción de IL-17, encontrándonos de nuevo con discrepancias entre la expresión de mRNA y los niveles de proteína de esta citocina. A este respecto, en el modelo experimental CIA se ha mostrado que la administración del péptido reduce los niveles proteicos de IL-17 y la expresión de ROR γ t (Juarranz *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2010). Nuestros resultados son contradictorios con los datos publicados en dicho trabajo. Diferentes causas podrían explicar estas discrepancias. En primer lugar, cabe mencionar que estos trabajos tienen lugar a partir de células murinas, en vez de linfocitos humanos procedentes de pacientes con AR. Respecto al trabajo de Deng y colaboradores, diferencias en la experimentación podrían estar involucradas ya que en su estudio se miden los niveles de IL-17 en cultivo procedentes de esplenocitos mononucleares totales en lugar de linfocitos Th periféricos y el análisis de la expresión del factor de transcripción se realiza sobre linfocitos T CD4 totales en vez de una población seleccionada y polarizada en cultivo *in vitro*. Por su parte, en el trabajo de Juarranz y colaboradores se muestra la expresión de IL-17 procedente de un homogeneizado de las articulaciones de ratones artríticos describiéndose por tanto el efecto general de VIP sobre la expresión de IL-17 en la articulación. A este respecto, cabe recordar que, además de las células Th17, otros tipos celulares son capaces de producir esta citocina, entre ellos los linfocitos T $\gamma\delta$. En este sentido, previamente se ha publicado la implicación de las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 en la patogenia de la AR en el modelo CIA (Roark *et al.*, 2007). De manera que, podría ser compatible que VIP promueva específicamente el desarrollo de las células Th17, mientras que su efecto general sobre la expresión de la IL-17 sea inhibidor debido a una acción reguladora negativa sobre otros tipos celulares, como por ejemplo los linfocitos T $\gamma\delta$.

En la AR, los procesos de proliferación y migración linfoide son muy importantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. El proceso proliferativo más destacado en la AR es la hiperplasia de los FLS. Sin embargo, la proliferación linfoide también es uno de los mecanismos involucrados en la inflamación que se produce en las articulaciones. En ellas se acumulan numerosas células inmunes procedentes de otras localizaciones anatómicas que se desplazan hasta la cavidad y la membrana sinoviales. Entre otras quimiocinas, en el sinovium se produce una gran producción de CCL20, lo que implica la migración de células que expresan CCR6 en su superficie (Matsui *et al.*, 2001; Ruth *et al.*, 2003; Tanida *et al.*, 2009). Por tanto, la producción de CCL20 en el sinovium conduce a un reclutamiento elevado de linfocitos Th17 en la articulación (Hirota *et al.*, 2007b; van Hamburg *et al.*, 2011). Una vez allí, las células Th17 favorecen aún más su propio reclutamiento ya que la IL-17 estimula sobre los FLS la producción de CCL20 (Hirota *et al.*, 2007a; van Hamburg *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta este “escenario” nos propusimos estudiar el **efecto de VIP en los pacientes artríticos sobre la capacidad de proliferación y la capacidad potencial de migración de las células Th17** tras la activación *in vitro* de linfocitos memoria Th ([Artículo 2](#)) y tras la polarización *in vitro* de estas células hacia el subtipo Th17 ([Artículo 4](#)).

En relación a la capacidad de proliferación de las células Th activadas *in vitro*, tal capacidad en las células de los pacientes comparada con las células de los donantes sanos es ligeramente superior,

aunque no significativamente. El porcentaje de proliferación es un 64% aproximadamente del total de células Th activadas *in vitro*, el cual no se ve modificado por la presencia de VIP. Por su parte, las células Th17 polarizadas *in vitro* de los pacientes presentan una mayor proliferación que las de los donantes sanos. Esta mayor proliferación en los pacientes comparado con los individuos sanos resulta esperable, puesto que esta subpoblación está fuertemente involucrada en la patogenia de la AR. El análisis de proliferación manifiesta que entorno al 60% de las células expresan RORC y Ki67, lo cual no se ve influido por la presencia del péptido.

Referente a la potencial capacidad de migración, las células Th activadas *in vitro* procedentes de los pacientes con fenotipo Th17 muestran una mayor capacidad potencial para migrar en respuesta a CCL20. Estas células presentan aproximadamente un 25% de células dobles positivas para RORC y CCR6. Como se menciona anteriormente, comparado con los donantes sanos, este porcentaje es mayor en las células Th activadas procedentes de los pacientes. Este hallazgo concuerda con investigaciones realizadas previamente en las que se ha observado que los pacientes con artritis temprana presentan un aumento en el porcentaje de células productoras de IL-17 que son dobles positivas para CD45RO y CCR6 (van Hamburg *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos estudios no muestran diferencias entre individuos sanos y pacientes con AR en el porcentaje de células Th productoras de IL-17 que expresan CCR6 (Jandus *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009). El aumento observado en nuestro estudio indica que la capacidad potencial de migración de las células Th de los pacientes es mayor, lo cual parece razonable teniendo en cuenta que la expresión de CCR6 les confiere la posibilidad de migrar a las articulaciones inflamadas donde se está produciendo CCL20. Este aumento en la expresión de CCR6 en los linfocitos Th puede ser por tanto una característica asociada a la AR. De hecho, siguiendo esta línea, van Hamburg y colaboradores proponen que CCR6 podría considerarse como un marcador biológico en el diagnóstico de la AR (van Hamburg *et al.*, 2011). Este parámetro funcional no se ve afectado por la presencia del péptido durante la activación *in vitro*. Por su parte, las células Th17 polarizadas *in vitro* procedentes de los pacientes no muestran diferencias en su potencial respuesta a CCL20 comparado con las células de los donantes sanos. Aproximadamente un 30% de las células Th17 de los pacientes son dobles positivas para RORC y CCR6. Aunque este porcentaje es algo mayor en los pacientes artríticos que en los donantes sanos, no existen diferencias significativas entre ellos. En este sentido, estudios previos tampoco encuentran diferencias entre donantes sanos y pacientes artríticos en el porcentaje de células Th productoras de IL-17 que expresan CCR6 (Jandus *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009). El análisis del efecto de VIP sobre este parámetro funcional muestra, al igual que en el caso de los donantes sanos, un ligero incremento en el porcentaje de células dobles positivas para RORC y CCR6 de los pacientes artríticos, pero éste no es significativo.

Como se describe anteriormente, la heterogeneidad fenotípica de las células Th17 está estrechamente relacionada con el desarrollo de la inflamación en diversas enfermedades de tipo inflamatorio y/o autoinmune. Concretamente en la AR, el microambiente inflamatorio generado en la articulación inflamada, en el que están presentes citocinas como IL-23 o IL-1 β , puede promover el fenotipo patogénico en las células Th17. Por ello, la posibilidad de modular el fenotipo de las células

Th17 en el marco de una de estas enfermedades constituiría un posible mecanismo terapéutico. En base a ello, evaluamos el **efecto de VIP en los pacientes artríticos sobre el fenotipo patogénico/no patogénico de las células Th** tras la activación *in vitro* de linfocitos memoria Th ([Artículo 2](#)) y tras la polarización *in vitro* de estas células hacia el subtipo Th17 ([Artículo 4](#)).

Primeramente analizamos el fenotipo patogénico/no patogénico de estas células y lo comparamos con el de las células de los donantes sanos. En relación a las células Th activadas *in vitro* observamos que las células procedentes de pacientes con AR presentan un fenotipo más patogénico que las de los donantes sanos ya que estas células producen mayores niveles de IFN γ y muestran una mayor expresión de IL-2 y T-bet. A pesar de que estos resultados sugieren la patogenicidad de estas células, tanto IFN γ como T-bet son marcadores característicos de la subpoblación Th1, por lo que estos resultados también pueden indicar un aumento en la funcionalidad de estas células en los pacientes artríticos. Por su parte, las células Th17 polarizadas *in vitro* procedentes de los pacientes muestran marcadores asociados a ambos fenotipos Th17 ya que presentan una producción aumentada de IL-9 y disminuida de GM-CSF e IL-10, a la vez que un incremento en la expresión de IL-9 e IL-2 y una disminución en la expresión de IL-22, IFN γ , T-bet e IL-10 respecto a las células Th activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Comparado con las células polarizadas procedentes de individuos sanos, las células Th17 de los pacientes muestran un fenotipo más patogénico ya que presentan una mayor producción de IL-22 e IFN γ y un aumento en la expresión de IL-22 e IL-2. En relación a esta última, varios trabajos han descrito su implicación en el desarrollo patológico de la AR, proponiéndose incluso como una diana terapéutica para el tratamiento de los pacientes ([Kozanidou et al., 2005](#)). Paralelamente, IFN γ también se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad ([Schurgers et al., 2011](#)). En referencia a la IL-22 y su papel en la AR, se han descrito funciones protectoras y pro-inflamatorias. Algunos trabajos en modelos animales sugieren que la presencia de esta citocina se relaciona con una disminución de la incidencia y la severidad de la enfermedad ([Geboes et al., 2009](#); [Sarkar et al., 2013](#)). Otros han propuesto una función dual dependiente de la fase de la enfermedad ([Justa et al., 2014](#)). Finalmente, diversos trabajos han manifestado su participación en el desarrollo de la AR ([Geboes et al., 2009](#); [Marijnissen et al., 2011](#)). En pacientes se ha descrito que los niveles de IL-22 se encuentran elevados en el suero y en las articulaciones inflamadas ([Ikeuchi et al., 2005](#); [Leipe et al., 2011](#); [Zhang et al., 2011](#); [da Rocha et al., 2012](#); [Zhang et al., 2012a](#); [Zhao et al., 2013](#)). Además, los niveles de IL-22 se han correlacionado con el grado de actividad de la enfermedad en los pacientes ([Leipe et al., 2011](#); [da Rocha et al., 2012](#)). De manera que, los datos apuntan más hacia un efecto patológico. Por tanto, teniendo en cuenta la expresión de todas estas citocinas, las células Th17 de los pacientes presentan un fenotipo más patogénico que las de los donantes sanos.

Puesto que las células Th activadas de los pacientes con AR muestran un fenotipo patogénico, la posibilidad de modular este fenotipo a través de VIP constituye un potencial mecanismo terapéutico en el tratamiento de la AR. En relación a las células Th activadas *in vitro*, VIP induce una disminución de la patogenicidad de estas células procedentes de los pacientes con AR temprana. La presencia del

neuropéptido durante la activación conduce a una disminución en la producción de la IL-21, así como una reducción en la expresión de esta citocina y de IL-2. Referente a la IL-21, se ha propuesto un efecto dual, promotor e inhibidor, de la citocina en la patogénesis de la AR (Marijnissen *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayoría de los trabajos apuntan hacia su participación en el desarrollo de la enfermedad (Yuan *et al.*, 2011). Aún más, en pacientes artríticos se ha descrito una expresión aumentada de esta citocina tanto en la articulación como en sangre periférica (Niu *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2010; Kwok *et al.*, 2012). Además, los niveles de esta citocina se han correlacionado con una mayor progresión de la enfermedad (Rasmussen *et al.*, 2010; Gottenberg *et al.*, 2012; Sglunda *et al.*, 2014). De manera que la inhibición mediada por VIP sobre esta citocina implica una disminución del potencial para causar patología de las células Th de los pacientes. Por su parte, respecto a las células Th17 polarizadas *in vitro*, VIP puede modular negativamente el fenotipo patogénico de estas células procedentes de los pacientes con AR de reciente comienzo. La presencia del péptido durante la polarización de las células Th de pacientes induce una disminución de la producción de IL-22. Dado que la IL-22 se ha relacionado con la patogenicidad de las células Th17, así como con el desarrollo de la AR, la inhibición mediada por VIP sobre la producción de esta citocina indica que el neuropéptido es capaz de modular negativamente el fenotipo patogénico de las células Th17 de los pacientes. Apoyando esta idea, los niveles de IL-9 e IL-10 aumentan en presencia del péptido, aunque no de forma estadísticamente significativa.

En ambos casos, el efecto de VIP observado parece algo menor que en las células procedentes de donantes sanos. Dado que VIP actúa sobre las células Th a través de VPAC₁ y VPAC₂, este menor efecto observado en los pacientes puede estar relacionado con la menor expresión de los mismos respecto a los donantes sanos. En este sentido, se ha descrito que en los PBMCs procedentes de pacientes, los cuales presentan menor expresión de VPAC₁, los niveles de cAMP producidos en respuesta a VIP son significativamente más bajos que los de los individuos sanos (Delgado *et al.*, 2008b). Paralelo a nuestros datos, estos autores también observan un efecto inhibitorio fuerte sobre la producción de citocinas inflamatorias en los PBMCs procedentes de donantes sanos, mientras que el efecto en los PBMCs de los pacientes es moderado (Delgado *et al.*, 2008b). Otra posible explicación surge a partir del cambio de patrón de expresión de los receptores entre los donantes sanos y los pacientes. Aunque las vías de señalización de ambos receptores presentan muchas similitudes, existen algunas diferencias entre la señalización activada por VPAC₁ y VPAC₂. De manera que, el aumento en la expresión de VPAC₂ sobre VPAC₁ aún mayor en los pacientes que en los donantes sanos, podría tener consecuencias a nivel de señalización intracelular que se tradujeran en el menor efecto observado para el péptido. En esta línea, previamente se ha sugerido que las diferencias en la expresión de ambos receptores en términos cualitativos y cuantitativos pueden estar fuertemente relacionados con las diferencias observadas en el efecto de VIP en relación con las enfermedades inflamatorias (Yadav y Goetzl, 2008). Por otro lado, también es posible que éste menor efecto observado sea consecuencia de las diferencias intrínsecas entre las células de los donantes sanos y las de los pacientes. La mayor patogenicidad mostrada por las células de los pacientes puede “ensombrear” el

efecto final ejercido por el péptido sobre un tipo celular que de partida está más comprometido con un fenotipo patogénico. Relacionado con nuestra propuesta, Leipe y colaboradores observan que las células Th17 de los pacientes con AR son más refractarias a la acción inhibidora de citocinas que de forma endógena inhiben su desarrollo que las células de los donantes sanos (Leipe *et al.*, 2010).

Sobre las células Th17, numerosas publicaciones han establecido una relación entre el perfil de tipo Th1 y el desarrollo de patología causada por estas células. Concretamente, se ha descrito que la expresión de T-bet así como la adquisición de la capacidad de producir IFN γ en las células Th17 es un factor crucial para el desarrollo de inflamación severa en varias patologías. Las células con fenotipo Th17/1 se han encontrado asociadas a enfermedad inflamatoria crónica, sugiriendo el carácter patogénico de estas células. Entre las diferentes enfermedades que cursan con inflamación crónica, la existencia de la transición de células Th17 hacia células Th1 y/o la presencia de células Th17/1 se ha relacionado con el desarrollo patológico en patologías tales como la enfermedad de Crohn (Annunziato *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009), la diabetes autoinmune (Bending *et al.*, 2009; Martin-Orozco *et al.*, 2009) o la esclerosis múltiple (Abromson-Leeman *et al.*, 2009; Kruschus *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2011; Duhen *et al.*, 2013). Así mismo, se ha descrito la presencia de células que co-expresan IFN γ e IL-17 en pacientes con AR (Yamada *et al.*, 2008; Colin *et al.*, 2010; van Hamburg *et al.*, 2011; Arroyo-VIL-la *et al.*, 2012). En esta patología es posible que la adquisición de un perfil Th17/1 se vea incrementada dado que en el microambiente inflamatorio pueden estar presentes citocinas que promueven este proceso. De hecho la posibilidad de que exista un aumento en la conversión de las células Th17 hacia Th1 en la articulación ya ha sido sugerida previamente (Nistala *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha propuesto que este fenómeno de plasticidad puede estar relacionado con el fallo de las terapias dirigidas frente a la IL-17 en los pacientes artríticos (Benedetti y Miossec, 2014), lo que subraya la importancia de estudiar la adquisición de un perfil Th17/1 en los pacientes. Dada la relación entre el perfil Th17/1 y la patología observada en estos estudios, ha sido propuesto que moléculas capaces de bloquear este proceso de re-diferenciación podrían constituir una nueva estrategia terapéutica útil en numerosas patologías inflamatorias y/o autoinmunes (Cosmi *et al.*, 2014). En este sentido, la inhibición mediada por VIP puede constituir un mecanismo de control sobre este proceso que resulte en un efecto beneficioso en estas patologías. Por ello, evaluamos el **efecto de VIP en los pacientes artríticos sobre el perfil Th17/1 de las células Th** tras la activación *in vitro* de linfocitos memoria Th (Artículo 2) y tras la polarización *in vitro* de estas células hacia el subtipo Th17 (Artículo 4).

En el caso de las células Th activadas *in vitro*, antes de testar el efecto de VIP evaluamos la población que resulta mayoritaria tras la activación *in vitro* de las células Th testando la presencia de linfocitos Th17 y Th1. Observamos que tras la activación las células Th de los pacientes artríticos muestran una mayor presencia de células Th17 que células Th1, así como una mayor proliferación en las primeras respecto a las segundas. Estos resultados concuerdan con los hallazgos anteriormente publicados, ya que varias investigaciones apuntan hacia un aumento de la respuesta de tipo Th17 sobre la de tipo Th1 en los pacientes (Shen *et al.*, 2009; van Hamburg *et al.*, 2011). No obstante, ambas subpoblaciones celulares se han descrito como células clave en la patogenia de esta enfermedad.

Inicialmente se ha destacado la función de las células Th1, productoras de IFN γ (MIL-tenburg *et al.*, 1992; Schlaak *et al.*, 1992; Quayle *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1993; Dolhain *et al.*, 1996). Sin embargo, la existencia de resultados contradictorios (Manoury-Schwartz *et al.*, 1997; Vermeire *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2003; Irmeler *et al.*, 2007; Hickman-Brecks *et al.*, 2011), así como el descubrimiento de la IL-23 y su implicación en el desarrollo de CIA (Oppmann *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003; Ratsimandresy *et al.*, 2011), han llevado a considerar la implicación de las células Th17 en el proceso patológico. Los estudios realizados desde entonces han permitido concluir que esta subpoblación linfóide participa activamente en el desarrollo de esta enfermedad (Nakae *et al.*, 2003b; Lubberts *et al.*, 2004; Irmeler *et al.*, 2007; Kelchtermans *et al.*, 2009a; Sarkar *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012). Ambos tipos celulares, Th1 y Th17, se encuentran asociados a la AR, hasta tal punto que permanece en debate cuál de las dos poblaciones está implicada mayoritariamente en el desarrollo de la enfermedad. Dada la presencia de células fenotipo intermedio se ha sugerido que las células Th17 estarían involucradas en la AR en un estado temprano de la enfermedad y gradualmente se convertirían a Th17/1, para ser finalmente re-emplazadas por las células Th1 durante el progreso de la AR (Kato *et al.*, 2013). Sin embargo, en artritis experimental un trabajo ha propuesto que las células Th1 se encuentran mayormente implicadas en fases tempranas y las Th17 en fases más tardías (Lamacchia *et al.*, 2010). Además, fundamentalmente en modelos animales se ha establecido la implicación de las células Th17 no sólo en el comienzo sino durante las diferentes fases de la enfermedad. Por tanto, este debate permanece abierto. Por ello, es importante seguir investigando acerca de la implicación de ambas subpoblaciones en la AR, con objeto de definir la estrategia terapéutica adecuada (anti-IL-17 o anti-IFN γ) en cada fase de la enfermedad. Teniendo en cuenta los resultados de nuestro trabajo, en el marco del debate sobre la implicación mayoritaria de una u otra subpoblación, nuestros resultados sugieren que las células Th17 presentan una función mayoritaria en pacientes con AR de reciente comienzo. Aunque varios trabajos similares ya han apuntado esta función mayoritaria, generalmente las investigaciones se llevan a cabo sobre células recién aisladas procedentes de la sangre de los pacientes. En nuestro estudio, al causar la activación linfóide simulamos la respuesta que se desencadenaría en estos pacientes durante la fase activa de la enfermedad en su comienzo, ya que son pacientes recién diagnosticados. Con todo, nuestro trabajo corrobora los datos anteriormente publicados y aporta nuevos matices sobre la implicación principal de las células Th17 en la AR.

Comparado con las células de los donantes sanos, las células Th activadas *in vitro* procedentes de pacientes con AR presentan un perfil funcional más asociado a Th1. En primer lugar, observamos que las células procedentes de los pacientes artríticos muestran una disminución en el porcentaje de células T-bet positivas. En este sentido, aunque algunos investigadores no encuentran diferencias en el porcentaje de células Th1 en AR (Yamada *et al.*, 2008; Leipe *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2011; Arroyo-VIL-la *et al.*, 2012), varios trabajos muestran una frecuencia disminuida de las células Th productoras de IFN γ en sangre periférica de pacientes artríticos comparado con controles sanos (Henriques *et al.*, 2013). En nuestro estudio se observa que la disminución del porcentaje de células que expresan T-bet se debe a una reducción en el porcentaje de células dobles positivas RORC/T-bet, mientras que los niveles de

células T-bet⁺/RORC⁻ o T-bet⁺/RORC⁺ no varían entre unos y otros. A este respecto, por una parte se ha mostrado un aumento en el porcentaje de células Th17/1 (Zhang *et al.*, 2012a). Por otra parte, algunos investigadores observan que no existen diferencias en el porcentaje de células IFN γ ⁺/IL-17⁺ en sangre periférica de los pacientes en comparación con donantes sanos (Yamada *et al.*, 2008; Leipe *et al.*, 2010; Henriques *et al.*, 2013). Finalmente, paralelo a nuestro estudio, otros autores han encontrado una frecuencia baja de células Th17/1 en sangre periférica de pacientes con AR temprana y artritis juvenil idiopática (Nistala *et al.*, 2010; Arroyo-VIL-la *et al.*, 2012). La conclusión que podría obtenerse de nuestros resultados es que existe una menor respuesta de tipo Th1 en los pacientes artríticos. Sin embargo, los análisis de expresión de mRNA y de producción de citocinas por las células Th activadas *in vitro* procedentes de los pacientes indican lo contrario ya que las células procedentes de los pacientes presentan una mayor producción de IFN γ , así como una mayor expresión de T-bet. La discrepancia entre unos análisis y otros puede ser explicada ya que, de alguna manera, un resultado no invalida el otro. Es posible que, aunque el porcentaje total de células que expresan T-bet sea menor en los pacientes, estas células presenten una mayor expresión de T-bet. Sería necesario realizar más estudios para corroborar esta hipótesis. No obstante, a pesar de la discrepancia en la expresión de este factor de transcripción, es importante destacar que a nivel funcional existe un aumento en la producción de IFN γ .

En relación a las células Th17 polarizadas *in vitro*, se observa una expresión reducida de IFN γ y T-bet comparado con las células procedentes de pacientes activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, [Artículos 2 y 4](#)). Sin embargo, comparado con las células procedentes de donantes sanos las células Th17 polarizadas de los pacientes muestran una mayor asociación con el fenotipo Th1, ya que presentan una mayor producción de IFN γ , un mayor ratio entre la producción de IFN γ e IL-17, y un aumento en la expresión de T-bet. Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que se ha publicado la existencia de células co-expresoras de IFN γ e IL-17 en pacientes con AR de reciente comienzo (Colin *et al.*, 2010; van Hamburg *et al.*, 2011; Arroyo-VIL-la *et al.*, 2012), lo que sugiere la existencia de este proceso de conversión en los pacientes. En la artritis juvenil idiopática el fenómeno de plasticidad de las células Th17 hacia Th1 se ha relacionado con el desarrollo patológico de la enfermedad (Nistala *et al.*, 2010; Cosmi *et al.*, 2011; Maggi *et al.*, 2012). En base a ello, es esperable que en nuestro estudio el fenotipo Th17/1 que muestran las células de los pacientes sea un indicativo de una mayor patogenicidad en dichas células con respecto a los donantes sanos.

Conocido el perfil Th17/1 de las células de los pacientes evaluamos su posible modulación por VIP. Respecto a las células Th activadas *in vitro*, no encontramos ningún efecto significativo del péptido en los pacientes con AR. Mientras que en el caso de las células Th17 polarizadas *in vitro*, los resultados sugieren que VIP puede disminuir el perfil Th17/1 en las células de los pacientes. Los resultados muestran que, al igual que en el caso de donantes sanos, la correlación entre T-bet y RORC, ausente en las células Th17 polarizadas sin VIP, es negativa cuando la polarización ocurre en presencia del neuropéptido.

En general, los resultados previos indican que las células Th de los pacientes muestran un perfil Th17 patogénico así como un perfil Th17/1, sobre los cuales mayoritariamente VIP muestra un efecto inhibitor. La posibilidad de que VIP además de inhibir estos perfiles promueva la adquisición de un perfil regulador en estas células podría constituir otro mecanismo inmunomodulador evitando el desarrollo de patología. Por ello, caracterizamos el **efecto de VIP en los pacientes con AR sobre la expresión de los marcadores de Treg y Th17 en las células Th17 polarizadas *in vitro*** (Artículo 4). Los datos de nuestro estudio sugieren que VIP puede promover el perfil regulador de las células Th17 polarizadas *in vitro* en pacientes con AR de reciente comienzo. En primer lugar, observamos que en los pacientes artríticos, tras el proceso de polarización las células presentan un aumento en la expresión de Foxp3, pero sin embargo la expresión de IL-10 está disminuida en comparación con las activadas en condiciones no polarizantes (análisis comparado, Artículos 2 y 4). Comparado con las células procedentes de donantes sanos las células Th17 polarizadas de los pacientes muestran una mayor expresión de Foxp3, pero sin embargo el ratio IL-10/IL-17 es menor, lo que sugiere que la función reguladora en los pacientes está desregulada. Este aumento en la expresión de Foxp3 en las células procedentes de los pacientes resulta llamativo. Sin embargo, ha sido documentado previamente un aumento de Foxp3 en las células procedentes de sangre periférica de los pacientes (Monte *et al.*, 2008). Así mismo, se ha sugerido que la función de estas células en la AR está desregulada, mostrándose una capacidad de supresión disminuida (Ehrenstein *et al.*, 2004; Valencia *et al.*, 2006). Por otra parte, los resultados obtenidos en el cultivo en presencia de VIP muestran que este neuropéptido induce un aumento en la expresión de Foxp3, incrementa el ratio IL-10/IL-17 y promueve la aparición de correlación positiva entre la expresión de Foxp3 y RORC en las células Th17 polarizadas de los pacientes con AR. En este sentido se ha publicado previamente que VIP previene de la disminución de la expresión de Foxp3 en artritis experimental (Chen *et al.*, 2008b), lo cual se encuentra relacionado con nuestros resultados.

En resumen, los resultados observados a partir de las células Th de los pacientes artríticos muestran que VIP inhibe la respuesta Th17 sobre el conjunto de las células Th, así como su fenotipo patogénico y su perfil Th17/1. Este efecto inhibitor sobre la respuesta Th17 ejercido por VIP *in vitro* podría producirse *in vivo*. El péptido endógeno es potencialmente capaz de modular los procesos inflamatorios desencadenados durante el desarrollo de la AR ya que puede ser producido por células inmunes de la articulación y además existe inervación VIPérgica en las articulaciones (Niissalo *et al.*, 2002). Algunos trabajos han mostrado niveles aumentados de VIP en el suero y en las articulaciones de los ratones y pacientes artríticos, lo que reflejaría un intento de regulación del proceso inflamatorio (Delgado *et al.*, 2002a; Buljevic *et al.*, 2013). Sin embargo, la presencia del péptido endógeno por sí sola no evita la aparición de la patología. En este sentido, recientemente se ha observado que los niveles de VIP en el suero de los pacientes tienden a ser menores que en los controles y, aún más, los pacientes que muestran niveles más bajos se corresponden con un peor pronóstico (Martinez *et al.*, 2014). Es posible que la administración exógena de VIP pudiera suplir este déficit y permitir que se produjera *in*

vivo la regulación mediada por este péptido, incluyendo la modulación de la respuesta linfoide de tipo Th17.

Los estudios mostrados en la presente Tesis Doctoral se realizan, a excepción del trabajo sobre los ratones NOD, a través de experimentos *in vitro*. No obstante, es interesante interrogarse sobre la posibilidad de que los efectos observados puedan tener lugar en el organismo *in vivo*, donde VIP es sintetizado de forma endógena. Sobre las células Th17, VIP promueve la diferenciación de esta subpoblación. Puesto que esta subpoblación linfoide se ha relacionado con el desarrollo de patología, cabría preguntarse si es lógico este péptido anti-inflamatorio promueva la diferenciación de una subpoblación linfoide que ha sido frecuentemente caracterizada como pro-inflamatoria. En este sentido, es preciso recordar que, las células Th17 muestran una función clave en la defensa frente a varios patógenos. En condiciones fisiológicas estas células se localizan en las mucosas, especialmente en la lámina propia del intestino delgado, donde desarrollan su función. Cabe recordar también que VIP es un neuropéptido endógeno que, entre otras localizaciones, se encuentra en el tracto gastrointestinal. De manera que, el efecto inductor de VIP sobre la generación y expansión de las células Th17, el cual podría tener lugar *in vivo*, puede mostrar una función fisiológica final beneficiosa a través de la inducción de la respuesta del huésped en la defensa frente a diversos patógenos.

La diversidad de patógenos sobre los cuales ejercen su acción las células Th17 se ha relacionado con la función fisiológica de su heterogeneidad fenotípica. Aunque tal función no se conoce, a grandes rasgos, se han postulado dos posibilidades acerca de la misma. Una de ellas es que la heterogeneidad funcional de estas células se vea influenciada por el tipo de patógeno que induce la activación linfoide. En este sentido, se ha observado que las células Th17 inducidas en presencia de *Candida albicans* co-expresan IL-17 e IFN γ , mientras que las inducidas durante la infección causada por *Staphylococcus aureus* co-expresan IL-17 e IL-10 (Zielinski *et al.*, 2012). De forma similar, la defensa frente a la infección por causada por *Citrobacter rodentium* requiere de IL-23 e IL-22 (Mangan *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008), ambas citocinas mayoritariamente asociadas a células Th17 patogénicas. De manera que, diferentes patógenos podrían inducir un fenotipo u otro. Así, la heterogeneidad funcional de las células Th17 puede conferir al huésped protección frente a diversos microorganismos. Otra posibilidad es que la heterogeneidad de estas células se vea influenciada por el sitio y las circunstancias microambientales presentes durante la activación. De este modo, en un ambiente con un alto contenido en TGF β , como el existente en las mucosas, se induce el desarrollo de células Th17 con fenotipo no patogénico. Este fenotipo no patogénico de las células Th17 localizadas en las mucosas es suficiente y necesario para la defensa del huésped, pero muestra un limitado potencial patogénico (Kuchroo y Awasthi, 2012). Contrariamente, en condiciones de inflamación, la presencia de citocinas pro-inflamatorias induciría el desarrollo de células Th17 patogénicas. De manera que, la heterogeneidad fenotípica de estas células permite al SI una mayor flexibilidad de respuesta en relación a diferentes patógenos, localizaciones anatómicas o situaciones, lo que puede dar lugar a una mayor eficacia en la defensa del huésped. En este sentido, la capacidad de VIP para modular el fenotipo no patogénico de las células Th17 cobra especial importancia. Dado que VIP se encuentra en

el tracto gastrointestinal, donde parece que se promueve el fenotipo no patogénico de estas células, la secreción endógena de este neuropéptido podría promover aún más este fenotipo. Por tanto, el efecto fisiológico final puede ser la promoción de la respuesta defensiva del huésped, contribuyendo en el aumento de la eficacia del SI en la protección frente a los patógenos.

Similar al proceso de diferenciación, VIP también promueve la polarización de las células memoria Th hacia el fenotipo Th17. Varios investigadores han sugerido que la re-diferenciación de los linfocitos Th ya diferenciados hacia otras subpoblaciones puede suponer un beneficio sobre la capacidad del SI de responder frente a las infecciones (O'Shea y Paul, 2010; Wan, 2010; Oestreich y Weinmann, 2012b; Coomes *et al.*, 2013). Este proceso podría facilitar una respuesta Th flexible cuando las condiciones microambientales cambian, mejorando así la estrategia del huésped. De tal modo que, en la presencia de un patógeno que requiera de una respuesta Th17 para su aclaramiento, la aparición en el microambiente de las citocinas adecuadas, puede inducir a otros linfocitos, sin capacidad para eliminar el patógeno, a re-diferenciarse hacia Th17 y bloquear así la infección. Siguiendo esta lógica, la función promotora de VIP sobre este proceso de polarización cuando las condiciones ambientales dirigen la respuesta hacia la subpoblación Th17, puede suponer un efecto beneficioso que aumente aún más la eficacia del huésped en la defensa frente a diversos microorganismos. Sin embargo, también se ha considerado que el proceso de polarización o re-diferenciación de los linfocitos Th se puede relacionar con la patología asociada a la infección (Coomes *et al.* 2013). Así, aunque la capacidad de las células Th17 de re-diferenciarse hacia células Th1 podría constituir un mecanismo de defensa del huésped para controlar por ejemplo una infección causada por un patógeno intracelular, más bien se ha relacionado con el desarrollo inflamatorio en varias patologías. Dada la relación mostrada entre la adquisición de un perfil de tipo Th1 en las células Th17 y la patología, ha sido propuesto que moléculas capaces de bloquear este proceso de re-diferenciación podrían constituir una nueva estrategia terapéutica útil en numerosas patologías inflamatorias y/o autoinmunes (Cosmi *et al.*, 2014). En este sentido, la inhibición mediada por VIP sobre la expresión de marcadores de tipo Th1 en las células Th17 observada *in vitro*, podría constituir un mecanismo inmunomodulador del péptido *in vivo* evitando el desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria causante de patología de tipo inflamatorio y/o autoinmune.

En relación a este tipo de patologías, los resultados observados indican que la administración del péptido podría dar lugar a un efecto final beneficioso en ambas patologías. Tal efecto podría ser extrapolable también a otras enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes en las que las células Th17 presentan una función destacada. No obstante, es necesario resaltar, que la función inmunomoduladora de VIP es muy amplia y abarca numerosos tipos celulares. De manera que, sin restarle importancia, es preciso hacer constar que los efectos mediados por VIP sobre la respuesta Th17 constituirían uno de los posibles mecanismos terapéuticos ejercidos por el péptido sobre estas enfermedades. Esta capacidad de VIP para modular un amplio espectro de funciones le ofrece una ventaja terapéutica frente al empleo de fármacos de acción específica, como anticuerpos neutralizantes o antagonistas de receptores que van dirigidos directamente frente a una única diana. Los efectos del

péptido son generalizados y casi ubicuos, dada la extensa distribución de sus receptores. Por tanto, la acción terapéutica puede ser mayor, abarcando diversos aspectos de la enfermedad. No obstante, la capacidad de modular varios tipos celulares puede resultar desventajoso si se requiere de una estrategia terapéutica muy concreta, puesto que se podrían encontrar efectos inespecíficos no deseados. Sin embargo, el posible uso clínico de VIP presenta otra ventaja puesto que se trata de un compuesto endógeno. En contraste con los fármacos anti-inflamatorios, el uso terapéutico de VIP no debería dar lugar a efectos secundarios graves, dado que es un componente fisiológico no tóxico, que rápidamente es metabolizado. Con todo, esta característica deseada se convierte también en un problema debido a la gran inestabilidad del péptido y su limitada biodisponibilidad. Para solventar este problema se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas. A pesar de tales esfuerzos, aún es necesario realizar más estudios con objeto de poder aplicar el péptido en el tratamiento de estas patologías. A este respecto, nuestros estudios no se realizan en el ámbito puramente clínico. Sin embargo, consideramos que presentan relevancia clínica ya que contribuyen a establecer la base biológica sobre la cual pueden desarrollarse nuevas estrategias terapéuticas que finalmente conduzcan a la mejoría de aquellas personas que padecen T1D o AR.

Conclusiones

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral son:

1. Los receptores VPAC₁ y VPAC₂ se expresan en los linfocitos Th humanos tras su activación *in vitro* y tras su diferenciación y polarización *in vitro* hacia el subtipo Th17.
2. Las células Th17 diferenciadas y las células Th17 polarizadas *in vitro* muestran un cambio en el patrón de expresión de los receptores de VIP que se traduce en un aumento del ratio VPAC₂/VPAC₁.
3. En los pacientes con AR temprana, los receptores VPAC₁ y VPAC₂ se expresan en los linfocitos memoria Th activados y polarizados a Th17 *in vitro*, mostrando una mayor expresión de ambos receptores en las células Th activadas y un aumento del ratio VPAC₂/VPAC₁ en las células Th17 polarizadas con respecto a las células de los donantes sanos.
4. VIP modula de forma diferencial las distintas subpoblaciones de células Th activadas *in vitro* procedentes de ratones Balb/c, inhibiendo las respuestas Th17 y Th1 y promoviendo la respuesta T reguladora
5. VIP modula los balances entre las subpoblaciones de células Th activadas *in vitro* procedentes de ratones Balb/c, aumentando los balances Th17/Th1, Th2/Th9, Treg/Th17 y Treg/Th1 y disminuyendo el balance Th1/Th2.
6. VIP inhibe la respuesta Th17, el fenotipo patogénico y el perfil Th17/1 del conjunto de linfocitos memoria Th humanos activados *in vitro* procedentes de donantes sanos.
7. VIP induce la diferenciación *in vitro* de las células Th17 humanas. Así mismo, VIP promueve su capacidad de proliferación e inhibe la adquisición de un perfil Th17/1 en dichas células.
8. VIP promueve la polarización *in vitro* de las células Th17 humanas a partir de linfocitos memoria Th humanos procedentes de donantes sanos. Además, aumenta su fenotipo no patogénico y favorece el perfil relacionado con una respuesta T reguladora a la vez que inhibe el perfil Th17/1.
9. En el modelo experimental de diabetes autoinmune NOD, VIP inhibe la respuesta Th17 a la vez que promueve la respuesta Treg. Así mismo, este neuropéptido modula los balances entre las diferentes subpoblaciones Th, aumentando los balances Th17/Th1 y Treg/Th17 y disminuyendo el balance Th1/Th2
10. Las células Th activadas y Th17 polarizadas *in vitro* procedentes de pacientes con AR temprana muestran una mayor respuesta de tipo Th17, un mayor fenotipo patogénico y un mayor perfil Th17/1 que las células de los donantes sanos.
11. En los pacientes con AR temprana, VIP ejerce un efecto inhibitor sobre la respuesta Th17 y el perfil patogénico del conjunto de linfocitos memoria Th activados *in vitro*.
12. En los pacientes con AR temprana, VIP promueve la respuesta Th17 de los linfocitos memoria Th tras su polarización *in vitro*. Además, inhibe su fenotipo patogénico y su perfil Th17/1, y aumenta el perfil Treg/Th17 en dichas células.

Bibliografía

-A-

- Abad C, Juarranz Y, Martinez C, Arranz A, Rosignoli F, García-Gómez M, Leceta J y Gomariz RP. *cDNA array analysis of cytokines, chemokines, and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP*. *Inflamm. Bowel Dis.*, **2005**; 11 (7): 674-84.
- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M y Gomariz RP. *Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease*. *Gastroenterology*, **2003**; 124 (4): 961-71.
- Abbas AK, Lichtman AH y Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 7ª edición. Barcelona: Ediciones Elsevier, **2012**. ISBN: 978-84-8086-916-4.
- Abraham SN y St John AL. *Mast cell-orchestrated immunity to pathogens*. *Nat. Rev. Immunol.*, **2012**; 10 (6): 440-52.
- Abromson-Leeman S, Bronson RT y Dorf ME. *Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFNgamma but have a spectrum of IL-17 profiles*. *J. Neuroimmunol.*, **2009**; 215 (1-2): 10-24.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A y Sallusto F. *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. *Nat. Immunol.*, **2007b**; 8 (9): 942-9.
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F y Napolitani G. *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. *Nat. Immunol.*, **2007a**; 8 (6): 639-46.
- Adamopoulos IE y Bowman EP. *Immune regulation of bone loss by Th17 cells*. *Arthritis Res. Ther.*, **2008**; 10 (5): 225.
- Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, Laface D, Blumenschein W, Iwakura Y, McClanahan T y Bowman EP. *Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors*. *Arthritis Res. Ther.*, **2010**; 12 (1): R29.
- Adamou JE, Aiyar N, Van Horn S y Elshourbagy NA. *Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**; 209 (2): 385-92.
- Adams DH y Lloyd AR. *Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines*. *Lancet*, **1997**; 349 (9050): 490-5.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL y Murphy KM. *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+T cells*. *Nat. Immunol.*, **2002**; 3 (6): 549-57.
- Afzali B, Mitchell PJ, Edozie FC, Povolieri GA, Dowson SE, Demandt L, Walter G, Canavan JB, Scotta C, Menon B, Chana PS, Khamri W, Kordasti SY, Heck S, Grimbacher B, Tree T, Cope AP, Taams LS, Lechler RI, John S y Lombardi G. *CD161 expression characterizes a subpopulation of human regulatory T cells that produces IL-17 in a STAT3-dependent manner*. *Eur. J. Immunol.*, **2013**; 43 (8): 2043-54.
- Aggarwal S y Gurney AL. *IL-17: prototype member of an emerging cytokine family*. *J. Leukoc. Biol.*, **2002**; 71 (1): 1-8.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ y Gurney AL. *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. *J. Biol. Chem.*, **2003**; 278 (3): 1910-4.
- Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ y Powrie F. *Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells*. *Immunity*, **2010**; 33 (2): 279-88.
- Ahmadzadeh M y Farber DL. *Functional plasticity of an antigen-specific memory CD4 T cell population*. *PNAS*, **2002**; 99 (18): 11802-7.
- Ahmed AA, Wahbi A, Nordlind K, Kharazmi A, Sundqvist KG, Mutt V y Lidén S. *In vitro Leishmania major promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides*. *Scand. J. Immunol.*, **1998**; 48 (1): 79-85.
- Ahmed AA, Wahbi AH y Nordlin K. *Neuropeptides modulate a murine monocyte/macrophage cell line capacity for phagocytosis and killing of Leishmania major parasites*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **2001**; 23 (3): 397-409.
- Ahrén B, Alumets J, Ericsson M, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L, Håkanson R, Hedner P, Lorén I, Melander A, Rerup C y Sundler F. *VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion*. *Nature*, **1980**; 287 (5780): 343-5.
- Ahrén B. *Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease*. *Diabetologia*, **2000**; 43 (4): 393-410.
- Aino H, Hashimoto H, Ogawa N, Nishino A, Yamamoto K, Nogi H, Nagata S y Baba A. *Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor*. *Gene*, **1995**; 164 (2): 301-4.
- Akashi T, Nagafuchi S, Anzai K, Kondo S, Kitamura D, Wakana S, Ono J, Kikuchi M, Niho Y y Watanabe T. *Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice*. *Int. Immunol.*, **1997**; 9 (8): 1159-64.
- Akimzhanov AM, Yang XO y Dong C. *Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation*. *J. Biol. Chem.*, **2007**; 282 (9): 5969-72.
- Al Khatib S, Keles S, Garcia-Lloret M, Karakoc-Aydiner E, Reisli I, Artac H, Camcioglu Y, Cokugras H, Somer A, Kutukculer N, Yilmaz M, Ikinciogullari A, Yegin O, Yüsek M, Genel F, Kucukosmanoglu E, Baki A, Bahceciler NN, Rambhatla A, Nickerson DW, McGhee S, Barlan IB y Chatila T. *Defects along the T(H)17 differentiation pathway underlie genetically distinct forms of the hyper IgE syndrome*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2009**; 124 (2): 342-8.
- Alba A, Planas R, Clemente X, Carrillo J, Ampudia R, Puertas MC, Pastor X, Tolosa E, Pujol-Borrell R, Verdaguer J y Vives-Pi M. *Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta*. *Clin. Exp. Immunol.*, **2008**; 151 (3): 467-75.
- Aliakbari J, Sreedharan SP, Turck CW y Goetzl EJ. *Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**; 148 (3): 1440-5.
- Allen JE y Maizels RM. *Diversity and dialogue in immunity to helminths*. *Nat. Rev. Immunol.*, **2011**; 11 (6): 375-88.
- Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB y Beller DI. *Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice*. *Diabetes*, **2000**; 49 (7): 1106-15.
- Almawi WY, Tamim H y Azar ST. *Clinical review 103: T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type 1 (insulin-dependent) diabetes*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1999**; 84 (5): 1497-502.
- Alonso-Ruiz A, Pijoan JL, Ansuategui E, Urkaregi A, Calabozo M y Quintana A. *Tumor necrosis factor alpha drugs in rheumatoid arthritis: systematic review and metaanalysis of efficacy and safety*. *BMC Musculoskelet Disord.*, **2008**; 9: 52.
- Alyanakian MA, You S, Damotte D, Gouarin C, Esling A, Garcia C, Havouis S, Chatenoud L y Bach JF. *Diversity of regulatory CD4+T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**; 100 (26): 15806-11.
- Anderson MS y Bluestone JA. *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. *Annu. Rev. Immunol.*, **2005**; 23: 447-85.
- Anderson P y Gonzalez-Rey E. *Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple levels*. *Mol. Cell. Biol.*, **2010**; 30 (10): 2537-51.
- Andersson AK, Feldmann M y Brennan FM. *Neutralizing IL-21 and IL-15 inhibits pro-inflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis*. *Scand. J. Immunol.*, **2008**; 68 (1): 103-11.
- Ankathatti Munegowda M, Deng Y, Chibbar R, Xu Q, Freywald A, Mulligan SJ, van Drunen Littel-van den Hurk S, Sun D, Xiong S y Xiang J. *A distinct role of CD4+ Th17- and Th17-stimulated CD8+ CTL in the pathogenesis of type 1 diabetes and experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J. Clin. Immunol.*, **2011**; 31 (5): 811-26.
- Annibale B, Fais S, Boirivant M, Delle Fave G y Pallone F. *Effects of high in vivo levels of vasoactive intestinal polypeptide on function of circulating lymphocytes in humans*. *Gastroenterology*, **1990**; 98 (6): 1693-8.
- Annunziato F y Romagnani S. *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. *Arthritis Res. Ther.*, **2009**; 11 (6): 257.
- Annunziato F y Romagnani S. *Mouse T helper 17 phenotype: not so different than in man after all*. *Cytokine*, **2011**; 56 (1): 112-5.
- Annunziato F y Romagnani S. *The transient nature of the Th17 phenotype*. *Eur. J. Immunol.*, **2010**; 40 (12): 3312-6.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudizi F, Romagnani P, Parronchi

- P, Tonelli F, Maggi E y Romagnani S. *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J. Exp. Med., **2007**; 204 (8): 1849-61.
- Aoki CA, Borchers AT, Ridgway WM, Keen CL, Ansari AA y Gershwin ME. *NOD mice and autoimmunity*. Autoimmun. Rev., **2005**; 4 (6): 373-9.
- Araki M, Chung D, Liu S, Rainbow DB, Chamberlain G, Garner V, Hunter KM, Vijaykrishnan L, Peterson LB, Oukka M, Sharpe AH, Sobel R, Kuchroo VK y Wicker LS. *Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice*. J. Immunol., **2009**; 183 (8): 5146-57.
- Arif S, Moore F, Marks K, Bouckennooghe T, Dayan CM, Planas R, Vives-Pi M, Powrie J, Tree T, Marchetti P, Huang GC, Gurzov EN, Pujol-Borrell R, Eizirik DL y Peakman M. *Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated β -cell death*. Diabetes, **2011**; 60 (8): 2112-9.
- Arnush M, Scarim AL, Heitmeier MR, Kelly CB y Corbett JA. *Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes*. J. Immunol., **1998**; 160 (6): 2684-91.
- Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C y Gomariz RP. *Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease*. Neuroimmunomodulation, **2008c**; 15 (1): 46-53.
- Arranz A, Androulidaki A, Zacharioudaki V, Martínez C, Margioris AN, Gomariz RP y Tsatsanis C. *Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages via Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide*. Mol. Immunol., **2008b**; 45 (10): 2970-80.
- Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C y Gomariz RP. *VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Mol. Immunol., **2008a**; 45 (11): 3065-73.
- Arreaza G, Salojin K, Yang W, Zhang J, Gill B, Mi QS, Gao JX, Meagher C, Cameron M y Delovitch TL. *Deficient activation and resistance to activation-induced apoptosis of CD8⁺ T cells is associated with defective peripheral tolerance in nonobese diabetic mice*. Clin. Immunol., **2003**; 107 (2): 103-15.
- Arroyo-Villa I, Bautista-Caro MB, Balsa A, Aguado-Acín P, Nuño L, Bonilla-Hernán MG, Puig-Kröger A, Martín-Mola E y Miranda-Carús ME. *Frequency of Th17 CD4⁺ T cells in early rheumatoid arthritis: a marker of anti-CCP seropositivity*. PLoS One, **2012**; 7 (8): e42189.
- Asano K, Ikegami H, Fujisawa T, Nishino M, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Hiromine Y, Fukai A y Oghira T. *Molecular scanning of interleukin-21 gene and genetic susceptibility to type 1 diabetes*. Hum. Immunol., **2007**; 68 (5): 384-91.
- Asano M, Toda M, Sakaguchi N y Sakaguchi S. *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. J. Exp. Med., **1996**; 184 (2): 387-96.
- Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D y Sugamura K. *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex*. J. Immunol., **2001**; 167 (1): 1-5.
- Askenasy EM y Askenasy N. *Is autoimmune diabetes caused by aberrant immune activity or defective suppression of physiological self-reactivity?*. Autoimmun. Rev., **2013**; 12 (5): 633-7.
- Assier E, Boissier MC y Dayer JM. *Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments*. Joint Bone Spine, **2010**; 77 (6): 532-6.
- Aujla SJ y Kolls JK. *IL-22: a critical mediator in mucosal host defense*. J. Mol. Med. (Berl.), **2009**; 87 (5): 451-4.
- Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y y Kolls JK. *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat. Med., **2008**; 14 (3): 275-81.
- Aujla SJ, Dubin PJ y Kolls JK. *Th17 cells and mucosal host defense*. Semin. Immunol., **2007**; 19 (6): 377-82.
- Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M y Weiner HL. *A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells*. Nat. Immunol., **2007**; 8 (12): 1380-9.
- Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Boley G y Valmori D. *Human memory FOXP3⁺ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2009**; 106 (21): 8635-40.
- Azar ST, Tamim H, Beyhum HN, Habbal MZ y Almawi WY. *Type I (insulin-dependent) diabetes is a Th1- and Th2-mediated autoimmune disease*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., **1999**; 6 (3): 306-10.
- Azizi G, Jadidi-Niaragh F y Mirshafiey A. *Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis*. Int. J. Rheum. Dis., **2013**; 16 (3): 243-53.
- Azzari C, Rossi ME, Resti M, Caldini AL, Carbonella R, Ciappi S y Vierucci A. *VIP restores natural killer cell activity depressed by hepatitis B surface antigen*. Viral Immunol., **1992**; 5 (3): 195-200.

-B-

- Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH y Mellor AL. *IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells*. J. Immunol., **2009**; 183 (4): 2475-83.
- Baecher-Allan C, Viglietta V y Hafler DA. *Inhibition of human CD4⁺CD25⁺(high) regulatory T cell function*. J. Immunol., **2002**; 169 (11): 6210-7.
- Baerwald CG, Burmester GR y Krause A. *Interactions of autonomic nervous, neuroendocrine, and immune systems in rheumatoid arthritis*. Rheum. Dis. Clin. North Am., **2000**; 26 (4): 841-57.
- Baggiolini M, Dewald B y Moser B. *Human Chemokines: An Update*. Annu. Rev. Immunol., **1997**; 15: 675-705.
- Bagley CJ, Woodcock JM, Stomski FC y Lopez AF. *The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors*. Blood, **1997**; 89 (5): 1471-82.
- Bajo AM, Juarranz MG, Valenzuela P, Martínez P, Prieto JC y Guijarro LG. *Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human uterus*. Peptides, **2000**; 21 (9): 1383-8.
- Bardos T, Czipri M, Vermes C, Finnegan A, Mikecz K y Zhang J. *CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells may not be involved in controlling autoimmune arthritis*. Arthritis Res. Ther., **2003**; 5 (2): R106-13.
- Bartok B y Firestein GS. *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. Immunol. Rev., **2010**; 233 (1): 233-55.
- Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, Jegou S, Lihmann I, Fournier A, Vaudry H y Gonzalez B. *Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development*. J. Comp. Neurol., **2000**; 425 (4): 495-509.
- Basu R, Hatton RD y Weaver CT. *The Th17 family: flexibility follows function*. Immunol. Rev., **2013**; 252 (1): 89-103.
- Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ y Ghilardi N. *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells*. Nat. Immunol., **2006**; 7 (9): 929-36.
- Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S y Krammer PH. *Regulation of T cell apoptosis during the immune response*. Curr. Mol. Med., **2002**; 2 (3): 257-72.
- Baumjohann D y Ansel KM. *MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity*. Nat. Rev. Immunol., **2013**; 13 (9): 666-78.
- Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH y Kuchroo VK. *The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells*. Nat. Immunol., **2009**; 10 (2): 167-75.
- Beckner SK y Farrar WL. *Potential of lymphokine-activated killer cell differentiation and lymphocyte proliferation by stimulation of protein kinase C or inhibition of adenylate cyclase*. J. Immunol., **1988**; 140 (1): 208-14.
- Beed EA, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM y Gaginella TS. *Demonstration of a functional receptor for vasoactive intestinal polypeptide on Molt 4b T lymphoblasts*. Regul. Pept., **1983**; 6 (1): 1-12.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ y

- Gregersen PK. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.*, **2004**; 75 (2): 330-7.
- Bellinger DL, Lorton D, Horn L, Brouxhon S, Felten SY y Felten DL. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of rat spleen, thymus, and lymph nodes. *Peptides*, **1997**; 18 (8): 1139-49.
- Belver L, Papavasiliou FN y Ramiro AR. MicroRNA control of lymphocyte differentiation and function. *Curr. Opin. Immunol.*, **2011**; 23 (3): 368-73.
- Bendelac A, Boitard C, Bedossa P, Bazin H, Bach JF y Carnaud C. Adoptive T cell transfer of autoimmune nonobese diabetic mouse diabetes does not require recruitment of host B lymphocytes. *J. Immunol.*, **1988**; 141 (8): 2625-8.
- Bendelac A, Carnaud C, Boitard C y Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J. Exp. Med.*, **1987**; 166 (4): 823-32.
- Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B y Cooke A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J. Clin. Invest.*, **2009**; 119 (3): 565-72.
- Bending D, Newland S, Krejci A, Phillips JM, Bray S y Cooke A. Epigenetic changes at IL12rb2 and Tbx21 in relation to plasticity behavior of Th17 cells. *J. Immunol.*, **2011**; 186 (6): 3373-82.
- Benedetti G y Miossec P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, **2014**; 44 (2): 339-47.
- Benyon RC, Robinson C y Church MK. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Br. J. Pharmacol.*, **1989**; 97 (3): 898-904.
- Beriou G, Bradshaw EM, Lozano E, Costantino CM, Hastings WD, Orban T, Elyaman W, Khoury SJ, Kuchroo VK, Baecher-Allan C y Hafler DA. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J. Immunol.*, **2010**; 185 (1): 46-54.
- Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C y Hafler DA. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*, **2009**; 113 (18): 4240-9.
- Berman MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldivar F Jr, Dadufalza V y Buckingham BA. Decreased IL-4 production in new onset type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Immunol.*, **1996**; 157 (10): 4690-6.
- Bertin-Maghit S, Pang D, O'Sullivan B, Best S, Duggan E, Paul S, Thomas H, Kay TW, Harrison LC, Steptoe R y Thomas R. Interleukin-1 β produced in response to islet autoantigen presentation differentiates T-helper 17 cells at the expense of regulatory T-cells: Implications for the timing of tolerizing immunotherapy. *Diabetes*, **2011**; 60 (1): 248-57.
- Bertrand G, Puech R, Maisonnasse Y, Bockaert J y Loubatières-Mariani MM. Comparative effects of PACAP and VIP on pancreatic endocrine secretions and vascular resistance in rat. *Br. J. Pharmacol.*, **1996**; 117 (4): 764-70.
- Besedovsky H, Sorkin E, Felix D y Haas H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunol.*, **1977**; 7 (5): 323-5.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL y Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, **2006**; 441 (7090): 235-8.
- Bickel U, Yoshikawa T, Landaw EM, Faull KF y Pardridge WM. Pharmacologic effects in vivo in brain by vector-mediated peptide drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**; 90 (7): 2618-22.
- Bik W, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Baranowska-Bik A, Rusiecka-Kuczalek E y Baranowska B. Vasoactive intestinal peptide can modulate immune and endocrine responses during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*, **2004**; 11 (6): 358-64.
- Bishop AE, Polak JM, Green IC, Bryant MG y Bloom SR. The location of VIP in the pancreas of man and rat. *Diabetologia*, **1980**; 18 (1): 73-8.
- Biswas PS, Gupta S, Chang E, Song L, Stirzaker RA, Liao JK, Bhagat G y Pernis AB. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J. Clin. Invest.*, **2010**; 120 (9): 3280-95.
- Blachère NE, Darnell RB y Albert ML. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol.*, **2005**; 3 (6): e185.
- Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J. Immunol.*, **1984**; 132 (3): 1067-70.
- Blaschitz C y Raffatellu M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J. Clin. Immunol.*, **2010**; 30 (2): 196-203.
- Block KE y Huang H. The cellular source and target of IL-21 in K/BxN autoimmune arthritis. *J. Immunol.*, **2013**; 191 (6): 2948-55.
- Bloom SR, Christofides ND, Delamarter J, Buell G, Kawashima E y Polak JM. Diarrhoea in vipoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by single coding gene. *Lancet*, **1983**; 2 (8360): 1163-5.
- Bluestone JA, Tang Q y Sedwick CE. T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J. Clin. Immunol.*, **2008**; 28 (6): 677-84.
- Bockaert J, Roussignol G, Bécamel C, Gavarini S, Joubert L, Dumuis A, Fagni L y Marin P. GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem. Soc. Trans.*, **2004**; 32 (Pt 5): 851-5.
- Bodanszky M, Klausner YS y Said SI. Biological activities of synthetic peptides corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1973**; 70 (2): 382-4.
- Bodner M, Fridkin M y Gozes I. Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**; 82 (11): 3548-51.
- Boirivant M, Fais S, Annibale B, Agostini D, Delle Fave G y Pallone F. Vasoactive intestinal polypeptide modulates the in vitro immunoglobulin A production by intestinal lamina propria lymphocytes. *Gastroenterology*, **1994**; 106 (3): 576-82.
- Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N y Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J. Autoimmun.*, **2012**; 39 (3): 222-8.
- Bolin DR, Cottrell J, Garippa R, Michalewsky J, Rinaldi N, Simko B y O'Donnell M. Structure-activity studies on the vasoactive intestinal peptide pharmacophore. 1. Analogs of tyrosine. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1995b**; 46 (3-4): 279-89.
- Bolin DR, Cottrell J, Garippa R, Rinaldi N, Senda R, Simko B y O'Donnell M. Comparison of cyclic and linear analogs of vasoactive intestinal peptide. *Drug Des. Discov.*, **1996**; 13 (3-4): 107-14.
- Bolin DR, Michalewsky J, Wasserman MA y O'Donnell M. Design and development of a vasoactive intestinal peptide analog as a novel therapeutic for bronchial asthma. *Biopolymers*, **1995a**; 37 (2): 57-66.
- Boltjes A y van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front. Immunol.*, **2014**; Apr 15:131.
- Bondesson L, Norolind K, Lidén S, Gafvelin G, Theodorsson E y Mutt V. Dual effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on leucocyte migration. *Acta Physiol. Scand.*, **1991**; 141 (4): 477-81.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A y Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.*, **1998**; 187 (1): 129-34.
- Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ y de Waal Malefyt R. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J. Exp. Med.*, **2009**; 206 (3): 535-48.
- Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC y Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.*, **2005**; 174 (6): 3695-702.
- Borboni P, Porzio O, Pierucci D, Cicconi S, Magnaterra R, Federici M, Sesti G, Lauro D, D'Agata V, Cavallaro S y Marlier LN. Molecular and functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38)/vasoactive intestinal polypeptide receptors in pancreatic beta-cells and effects of PACAP-38 on components of the insulin secretory system. *Endocrinology*, **1999**; 140 (12): 5530-7.
- Borboni P, Porzio O, Pierucci D, Cicconi S, Magnaterra R, Federici M, Sesti G, Lauro D, D'Agata V, Cavallaro S y Marlier LN. Molecular and

- functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38)/vasoactive intestinal polypeptide receptors in pancreatic beta-cells and effects of PACAP-38 on components of the insulin secretory system. *Endocrinology*, **1999**; 140 (12): 5530-7.
- Borish LC y Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2003**; 111 (2 Suppl.): S460-75.
- Bot I, de Jager SC, Bot M, van Heiningen SH, de Groot P, Veldhuizen RW, van Berkel TJ, von der Thüsen JH y Biessen EA. The neuropeptide substance P mediates adventitial mast cell activation and induces intraplaque hemorrhage in advanced atherosclerosis. *Circ. Res.*, **2010**; 106 (1): 89-92.
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A y Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, **1974**; 2 (7892): 1279-83.
- Bottini N, Vang T, Cucca F y Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin. Immunol.*, **2006**; 18 (4): 207-13.
- Boudaly S, Morin J, Berthier R, Marche P y Boitard C. Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur. Cytokine Netw.*, **2002**; 13 (1): 29-37.
- Boudard F y Bastide M. Inhibition of mouse T-cell proliferation by CGRP and VIP: effects of these neuropeptides on IL-2 production and cAMP synthesis. *J. Neurosci. Res.*, **1991**; 29 (1): 29-41.
- Boullaran C y Kehrl JH. Implications of non-canonical G-protein signaling for the immune system. *Cell. Signal.*, **2014**; 26 (6): 1269-82.
- Bourne HR, Lichtenstein LM, Melmon KL, Henney CS, Weinstein Y y Shearer GM. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science*, **1974**; 184 (4132): 19-28.
- Brabet P, Diriong S, Journot L, Bockaert J y Taviaux S. Localization of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PACAP1-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **1996**; 38 (1): 100-2.
- Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC y Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol.*, **2009**; 183 (7): 4432-9.
- Brady AE y Limbird LE. G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell. Signal.*, **2002**; 14 (4): 297-309.
- Braun O, Pirzer H y Fickenscher H. Interleukin-26, a highly cationic T-cell cytokine targeting epithelial cells. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, **2012**; 11 (3): 221-9.
- Braun T y Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, **2011**; 13 (4): 235.
- Brauner H, Elemans M, Lemos S, Broberger C, Holmberg D, Flodström-Tullberg M, Kärre K y Höglund P. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, **2010**; 184 (5): 2272-80.
- Breedveld FC. Future trends in the treatment of rheumatoid arthritis: cytokine targets. *Rheumatology (Oxford)*, **1999**; 38 Suppl 2: 11-3.
- Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M y Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.*, **2000**; 192 (11): 1545-52.
- Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, Scheinberg P, Price DA, Hage CA, Kholi LM, Khoruts A, Frank I, Else J, Schacker T, Silvestri G y Douek DC. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*, **2008**; 112 (7): 2826-35.
- Brennan FM y McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, **2008**; 118 (11): 3537-45.
- Brenneman DE y Eiden LE. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**; 83 (4): 1159-62.
- Brenneman DE. Neuroprotection: a comparative view of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1720-6.
- Bresnahan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D y Musikic P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.*, **1998**; 41 (12): 2196-204.
- Brooks-Worrell B y Palmer JP. Prevention versus intervention of type 1 diabetes. *Clin. Immunol.*, **2013**; 149 (3): 332-8.
- Bruni A, Gala-Lopez B, Pepper AR, Abualhassan NS y Shapiro AJ. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **2014**; 7: 211-23.
- Brusko T y Atkinson M. Treg in type 1 diabetes. *Cell. Biochem. Biophys.*, **2007**; 48 (2-3): 165-75.
- Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA y Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*, **2005**; 54 (5): 1407-14.
- Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T y Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.*, **2007**; 8 (9): 958-66.
- Bucht A, Larsson P, Weisbrot L, Thorne C, Pisa P, Smedegård G, Keystone EC y Grönberg A. Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.*, **1996**; 103 (3): 357-67.
- Buljevic S, Detel D, Pucar LB, Mihelic R, Madarevic T, Sestan B y Varljen J. Levels of dipeptidyl peptidase IV/CD26 substrates neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Int.*, **2013**; 33 (11): 2867-74.
- Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR y Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (1): 280-90.
- Burleigh DE y Banks MR. Stimulation of intestinal secretion by vasoactive intestinal peptide and cholera toxin. *Auton. Neurosci.*, **2007**; 133 (1): 64-75.
- Bush KA, Farmer KM, Walker JS y Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.*, **2002**; 46 (3): 802-5.
- Busto R, Carrero I, Guijarro LG, Solano RM, Zapatero J, Nogueras F y Prieto JC. Expression, pharmacological, and functional evidence for PACAP/VIP receptors in human lung. *Am. J. Physiol.*, **1999**; 277 (1 Pt 1): L42-8.
- Cai L, Suboc P, Hogue DA, Fei DT y Filvaroff EH. Interleukin 17 induced nitric oxide suppresses matrix synthesis and protects cartilage from matrix breakdown. *J. Rheumatol.*, **2002**; 29 (8): 1725-36.
- Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS y Filvaroff EH. Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine*, **2001**; 16 (1): 10-21.
- Calderon B y Unanue ER. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.*, **2012**; 24 (1): 119-28.
- Calvo JR, Guerrero JM, López-Gonzalez MA, Osuna C y Segura JJ. Characteristics of receptors for VIP in rat peritoneal macrophage membranes. *Peptides*, **1994b**; 15 (2): 309-15.
- Calvo JR, Molinero P, Jimenez J, Goberna R y Guerrero JM. Interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with rat lymphoid cells. *Peptides*, **1986**; 7 (2): 177-81.
- Calvo JR, Montilla ML, Guerrero JM y Segura JJ. Expression of VIP receptors in mouse peritoneal macrophages: functional and molecular characterization. *J. Neuroimmunol.*, **1994a**; 50 (1): 85-93.
- Camelo S, Lajavardi L, Bochot A, Goldenberg B, Naud MC, Brunel N, Lescure B, Klein C, Fattal E, Behar-Cohen F y de Kozak Y. Protective effect of intravitreal injection of vasoactive intestinal peptide-loaded liposomes on experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **2009**; 25 (1): 9-21.
- Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S y Delovitch TL. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J. Immunol.*, **1997**; 159 (10): 4686-92.

- Cameron MJ, Strathdee CA, Holmes KD, Arreaza GA, Dekaban GA y Delovitch TL. *Biologic-mediated interleukin 4 gene transfer prevents the onset of type 1 diabetes*. Hum. Gene. Ther. **2000**; 11 (12): 1647-56.
- Campbell DJ y Koch MA. *Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells*. Nat. Rev. Immunol., **2011**; 11 (2): 119-30.
- Cannons JL, Lu KT y Schwartzberg PL. *T follicular helper cell diversity and plasticity*. Trends Immunol., **2013**; 34 (5): 200-7.
- Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L y Trollmo C. *Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis*. Eur. J. Immunol., **2003**; 33 (1): 215-23.
- Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C y Malmström V. *CD25brightCD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease*. Arthritis Res. Ther., **2004**; 6 (4): R335-46.
- Cao YJ, Gimpl G y Fahrenholz F. *The amino-terminal fragment of the adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor functions as a high affinity PACAP binding domain*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **1995**; 212 (2): 673-80.
- Caporali R, Bugatti S, Cavagna L, Antivalle M y Sarzi-Puttini P. *Modulating the co-stimulatory signal for T cell activation in rheumatoid arthritis: could it be the first step of the treatment?*. Autoimmun. Rev., **2014**; 13 (1): 49-53.
- Cardozo AK, Kruhøffer M, Leeman R, Orntoft T y Eizirik DL. *Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays*. Diabetes, **2001**; 50 (5): 909-20.
- Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C y Eizirik DL. *IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice*. Diabetologia, **2003**; 46 (2): 255-66.
- Carmena MJ, Solano RM, Guijarro LG y Prieto JC. *PACAP-preferring receptors in human hyperplastic prostate*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **1996**; 805: 708-12.
- Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A y EPISER Study Group. *The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain*. Rheumatology (Oxford), **2002**; 41 (1): 88-95.
- Carrasco-Marin E, Shimizu J, Kanagawa O y Unanue ER. *The class II MHC I-Ag7 molecules from non-obese diabetic mice are poor peptide binders*. J. Immunol., **1996**; 156 (2): 450-8.
- Carrión M, Juarranz Y, Martínez C, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I y Gomariz RP. *IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Rheumatology (Oxford), **2013**; 52 (12): 2177-86.
- Carrión M, Juarranz Y, Pérez-García S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP y Gutiérrez-Cañas I. *RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide*. Arthritis Rheum., **2011**; 63 (6): 1626-36.
- Carrión M, Juarranz Y, Seoane IV, Martínez C, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I y Gomariz RP. *VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction*. J. Mol. Neurosci., **2014**; 52 (1): 10-7.
- Carroll HP, Paunovic V y Gadina M. *Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity*. Rheumatology (Oxford), **2008**; 47 (9): 1269-77.
- Carvalho H, da Silva JA y Souto-Carneiro MM. *Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis*. Autoimmun. Rev., **2013**; 12 (3): 401-9.
- Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM y Fonseca JE. *Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors*. Autoimmun. Rev., **2010**; 9 (8): 531-5.
- Cassani B, Villablanca EJ, De Calisto J, Wang S y Mora JR. *Vitamin A and immune regulation: role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance*. Mol. Aspects Med., **2012**; 33 (1): 63-76.
- Caughey GH, Leidig F, Viro NF y Nadel JA. *Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase*. J. Pharmacol. Exp. Ther., **1988**; 244 (1): 133-7.
- Cauvin A, Robberecht P, De Neef P, Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC y Christophe J. *Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord*. Regul. Pept., **1991**; 35 (2): 161-73.
- Ceraudo E, Hierso R, Tan YV, Murail S, Rouyer-Fessard C, Nicole P, Robert JC, Jamin N, Neumann JM, Robberecht P, Laburthe M y Couvineau A. *Spatial proximity between the VPAC1 receptor and the amino terminus of agonist and antagonist peptides reveals distinct sites of interaction*. FASEB J., **2012**; 26 (5): 2060-71.
- Cerosaletti K y Buckner JH. *Protein tyrosine phosphatases and type 1 diabetes: genetic and functional implications of PTPN2 and PTPN22*. Rev. Diabet. Stud., **2012**; 9 (4): 188-200.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L y Miossec P. *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium*. Arthritis Rheum., **1999**; 42 (5): 963-70.
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL y Miossec P. *Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines*. J. Immunol., **1998**; 161 (1): 409-14.
- Chabaud M, Garnerio P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F y Miossec P. *Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis*. Cytokine, **2000**; 12 (7): 1092-9.
- Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van Den Berg W y Miossec P. *IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res., **2001b**; 3 (3): 168-77.
- Chabaud M, Page G y Miossec P. *Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines*. J. Immunol., **2001a**; 167 (10): 6015-20.
- Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahji AN, Han L, Nguyen ET, Robertson MJ, Perumal NB, Tepper RS, Nutt SL y Kaplan MH. *The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation*. Nat. Immunol. **2010**; 11 (6): 527-34.
- Chang SH y Dong C. *IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation*. Cytokine, **2009**; 46 (1): 7-11.
- Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ y Dong C. *Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E*. Immunity, **2011**; 35 (4): 611-21.
- Chao CC, Chen SJ, Adamopoulos IE, Davis N, Hong K, Vu A, Kwan S, Fayadat-Dilman L, Asio A y Bowman EP. *Anti-IL-17A therapy protects against bone erosion in experimental models of rheumatoid arthritis*. Autoimmunity, **2011**; 44 (3): 243-52.
- Chatenoud L, Thervet E, Primo J y Bach JF. *Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1994**; 91 (1): 123-7.
- Chatterjee TK, Sharma RV y Fisher RA. *Molecular cloning of a novel variant of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor that stimulates calcium influx by activation of L-type calcium channels*. J. Biol. Chem., **1996**; 271 (50): 32226-32.
- Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. *CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner*. Science, **2009**; 326 (5955): 986-91.
- Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC y Lan JL. *Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy*. Arthritis Res. Ther., **2011c**; 13 (4): R126.
- Chen G, Hao J, Xi Y, Wang W, Wang Z, Li N y Li W. *The therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental arthritis is associated with CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells*. Scand. J. Immunol., **2008b**; 68 (6): 572-8.
- Chen J, Li J, Gao H, Wang C, Luo J, Lv Z y Li X. *Comprehensive evaluation of different T-helper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis*. J. Biomed. Biotechnol., **2012**; 2012: 535361.
- Chen K, McAleer JP, Lin Y, Paterson DL, Zheng M, Alcorn JF, Weaver CT y Kolls JK. *Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity*. Immunity, **2011a**; 35 (6): 997-1009.
- Chen MC, Proost P, Gysemans C, Mathieu C y Eizirik DL. *Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells*. Diabetologia, **2001**; 44 (3): 325-32.

- Chen Q, Yang W, Gupta S, Biswas P, Smith P, Bhagat G y Pernis AB. IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor. *Immunity*, **2008a**; 29 (6): 899-911.
- Chen R, Stahl EA, Kurreeman FA, Gregersen PK, Siminovitch KA, Worthington J, Padyukov L, Raychaudhuri S y Plenge RM. Fine mapping the TAGAP risk locus in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.*, **2011b**; 12 (4): 314-8.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, y Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.*, **2003a**; 198 (12): 1875-86.
- Chen XL, Bobbala D, Rodriguez GM, Mayhue M, Chen YG, Ilangumaran S y Ramanathan S. Induction of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice requires interleukin-21-dependent activation of autoreactive CD8⁺ T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, **2013**; 173 (2): 184-94.
- Chen Y, Thai P, Zhao YH, Ho YS, DeSouza MM y Wu R. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J. Biol. Chem.*, **2003b**; 278 (19): 17036-43.
- Chen Z, Herman AE, Matos M, Mathis D y Benoist C. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.*, **2005**; 202 (10): 1387-97.
- Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Yoshimura A, Hennighausen L y O'Shea JJ. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**; 103 (21): 8137-42.
- Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A y O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum.*, **2007**; 56 (9): 2936-46.
- Cheng PP, Sreedharan SP, Kishiyama JL y Goetzl EJ. The SKW 6.4 line of human B lymphocytes specifically binds and responds to vasoactive intestinal peptide. *Immunology*, **1993**; 79 (1): 64-8.
- Chew LJ, Murphy D y Carter DA. Alternatively polyadenylated vasoactive intestinal peptide mRNAs are differentially regulated at the level of stability. *Mol. Endocrinol.*, **1994**; 8 (5): 603-13.
- Chew LJ, Seah V, Murphy D y Carter D. Anterior pituitary vasoactive intestinal peptide mRNA is localised with prolactin mRNA in hyperoestrogenised rats. *J. Mol. Endocrinol.*, **1996**; 16 (3): 211-20.
- Chizzolini C, Chicheportiche R, Alvarez M, de Rham C, Roux-Lombard P, Ferrari-Lacraz S y Dayer JM. Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood*, **2008**; 112 (9): 3696-703.
- Cho ML, Jung YO, Kim KW, Park MK, Oh HJ, Ju JH, Cho YG, Min JK, Kim SI, Park SH y Kim HY. IL-17 induces the production of IL-16 in rheumatoid arthritis. *Exp. Mol. Med.*, **2008**; 40 (2): 237-45.
- Chorny A y Delgado M. Neuropeptides rescue mice from lethal sepsis by down-regulating secretion of the late-acting inflammatory mediator high mobility group box 1. *Am. J. Pathol.*, **2008**; 172 (5): 1297-307.
- Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Pozo D, Ganea D y, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**; 102 (38): 13562-7.
- Christen U. Chemokines as drug targets in type 1 diabetes. *Endocr. Metab. Immune Disord Drug Targets*, **2007**; 7 (1): 7-12.
- Christianson SW, Shultz LD y Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*, **1993**; 42 (1): 44-55.
- Christophe J, Chatelain P, Taton G, Delhay M, Waelbroeck M y Robberecht P. Comparison of VIP-secreting receptors in rat and human lung. *Peptides*, **1981**; 2 Suppl 2: 253-8.
- Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N y Sexton PM. Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J. Biol. Chem.*, **2003**; 278 (5): 3293-7.
- Chu A, Caldwell JS y Chen YA. Identification and characterization of a small molecule antagonist of human VPAC(2) receptor. *Mol. Pharmacol.*, **2010**; 77 (1): 95-101.
- Chu CQ, Song Z, Mayton L, Wu B y Wooley PH. IFNgamma deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vbeta6 and Vbeta8 in arthritic joints. *Ann. Rheum. Dis.*, **2003**; 62 (10): 983-90.
- Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q y Dong C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, **2009**; 30 (4): 576-87.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S y Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, **2005**; 54 Suppl 2: S97-107.
- Cobo M, Anderson P, Benabdellah K, Toscano MG, Muñoz P, García-Pérez A, Gutierrez I, Delgado M y Martin F. Mesenchymal stem cells expressing vasoactive intestinal peptide ameliorate symptoms in a model of chronic multiple sclerosis. *Cell. Transplant.*, **2013**; 22 (5): 839-54.
- Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesse L, Fontana A, Magnenat L, Suter T y Becher B. RORγt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (6): 560-7.
- Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, Dai EL, Mager DL y Levings MK. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J. Immunol.*, **2011**; 187 (11): 5615-26.
- Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, van Leeuwen JP y Lubberts E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2010**; 62 (1): 132-42.
- Concannon P, Rich SS y Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N. Engl. J. Med.*, **2009**; 360 (16): 1646-54.
- Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, Ho AW, Hai JH, Yu JJ, Jung JW, Filler SG, Masso-Welch P, Edgerton M y Gaffen SL. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.*, **2009**; 206 (2): 299-311.
- Cooler FA, Isaacs JD y Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Curr. Rheumatol. Rep.*, **2013**; 15 (9): 352.
- Coomes SM, Pelly VS y Wilson MS. Plasticity within the αβ+CD4+ T-cell lineage: when, how and what for?. *Open Biol.*, **2013**; 3 (1): 120157.
- Cope A, Le Friec G, Cardone J y Kemper C. The Th1 life cycle: molecular control of IFN-γ to IL-10 switching. *Trends Immunol.*, **2011**; 32 (6): 278-86.
- Cope AP, Schulze-Koops H y Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **2007**; 25 (5 Suppl 46): S4-11.
- Coquet JM, Chakravarti S, Smyth MJ y Godfrey DI. Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **2008**; 180 (11): 7097-101.
- Coquet JM, Kyriassoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ y Godfrey DI. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (5): 2827-34.
- Cornish AL, Campbell IK, McKenzie BS, Chatfield S y Wicks IP. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **2009**; 5 (10): 554-9.
- Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, Bugatti S, Ugucioni M y Pitzalis C. Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol. Lett.*, **2012**; 145 (1-2): 62-7.
- Corthay A. How do regulatory T cells work?. *Sacnd. J. Immunol.*, **2009**; 70 (4): 326-36.
- Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F, Frosali F, Querci V, Simonini G, Barra G, Piccinni MP, Liotta F, De Palma R, Maggi E, Romagnani S y Annunziato F. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2011**; 63 (8): 2504-15.
- Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, Berrino L, Fambrini M, Caproni M, Tonelli F, Lazzeri E, Parronchi P, Liotta F, Maggi E, Romagnani S y Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.*, **2008**; 205 (8): 1903-16.
- Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S y Annunziato F. Identification of a novel subset of

- human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2010**; 125 (1): 222-30.
- Couvineau A y Laburthe M. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**; 166 (1): 42-50.
- Couvineau A, Ceraudo E, Tan YV, Nicole P y Laburthe M. *The VPAC1 receptor: structure and function of a class B GPCR prototype*. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **2012**; 3: 139.
- Couvineau A, Fabre C, Gaudin P, Maoret JJ y Laburthe M. *Mutagenesis of N-glycosylation sites in the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor. Evidence that asparagine 58 or 69 is crucial for correct delivery of the receptor to plasma membrane*. *Biochemistry*, **1996b**; 35 (6): 1745-52.
- Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Nicole P y Laburthe M. *Highly conserved aspartate 68, tryptophane 73 and glycine 109 in the N-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**; 206 (1): 246-52.
- Couvineau A, Lacapere JJ, Tan YV, Rouyer-Fessard C, Nicole P y Laburthe M. *Identification of cytoplasmic domains of hVPAC1 receptor required for activation of adenylyl cyclase. Crucial role of two charged amino acids strictly conserved in class II G protein-coupled receptors*. *J. Biol. Chem.*, **2003**; 278 (27): 24759-66.
- Couvineau A, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Carrero I y Laburthe M. *The human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 (VPAC1) promoter: characterization and role in receptor expression during enterocytic differentiation of the colon cancer cell line Caco-2Cl.20*. *Biochem. J.*, **2000**; 347 Pt 3: 623-32.
- Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Maoret JJ, Gaudin P, Nicole P y Laburthe M. *Vasoactive intestinal peptide (VIP)1 receptor. Three nonadjacent amino acids are responsible for species selectivity with respect to recognition of peptide histidine isoleucineamide*. *J. Biol. Chem.*, **1996a**; 271 (22): 12795-800.
- Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Voisin T y Laburthe M. *Functional and immunological evidence for stable association of solubilized vasoactive-intestinal-peptide receptor and stimulatory guanine-nucleotide-binding protein from rat liver*. *Eur. J. Biochem.*, **1990**; 187 (3): 605-9.
- Cozzi B. *Vipergic innervation of the mammalian pineal gland*. *Microsc. Res. Tech.*, **1999**; 46 (4-5): 257-64.
- Creusot RJ, Yaghoubi SS, Kodama K, Dang DN, Dang VH, Breckpot K, Thielemans K, Gambhir SS y Fathman CG. *Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice*. *Clin. Immunol.*, **2008**; 127 (2): 176-87.
- Crotty S. *Follicular helper CD4 T cells (TFH)*. *Annu. Rev. Immunol.*, **2011**; 29: 621-63.
- Crum-Cianflone N, Weekes J y Bavaro M. *Recurrent community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections among HIV-infected persons: incidence and risk factors*. *AIDS Patient Care STDS*, **2009**; 23 (7): 499-502.
- Cua DJ y Tato CM. *Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system*. *Nat. Rev. Immunol.*, **2010**; 10 (7): 479-89.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA y Sedgwick JD. *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. *Nature*, **2003**; 421 (6924): 744-8.
- Culina S, Brezar V y Mallone R. *Insulin and type 1 diabetes: immune connections*. *Eur. J. Endocrinol.*, **2013**; 168 (2): R19-31.
- Curtis MM y Way SS. *Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens*. *Immunology*, **2009**; 126 (2): 177-85.
- Cutz E, Chan W, Track NS, Goth A y Said SI. *Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators*. *Nature*, **1978**; 275 (5681): 661-2.
- D-
- da Rocha LF Jr, Duarte ÂL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta Ida R, Galdino SL y Pitta MG. *Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity*. *J. Rheumatol.*, **2012**; 39 (7): 1320-5.
- Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L y Hedlund G. *Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse*. *J. Immunol.*, **1998**; 160 (7): 3585-93.
- Dale DC, Boxer L y Liles WC. *The phagocytes: neutrophils and monocytes*. *Blood*, **2008**; 112: 935-45.
- Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ y Brand S. *The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation*. *Gut*, **2009**; 58 (9): 1207-17.
- D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A y Sinigaglia F. *Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells*. *J. Immunol.*, **1998**; 161 (10): 5111-5.
- Danek A, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM y George JM. *Specific binding sites for vasoactive intestinal polypeptide on nonadherent peripheral blood lymphocytes*. *J. Immunol.*, **1983**; 131 (3): 1173-7.
- Danese S y Fiocchi C. *Ulcerative colitis*. *N. Engl. J. Med.*, **2011**; 365 (18): 1713-25.
- Dangoor D, Biondi B, Gobbo M, Vachutinski Y, Fridkin M, Gozes I y Rocchi R. *Novel glycosylated VIP analogs: synthesis, biological activity, and metabolic stability*. *J. Pept. Sci.*, **2008**; 14 (3): 321-8.
- Dangoor D, Rubinraut S, Fridkin M y Gozes I. *Novel analogs of VIP with multiple C-terminal domains*. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1622-30.
- Dangoor D, Rubinraut S, Fridkin M y Gozes I. *Novel extended and branched N-terminal analogs of VIP*. *Regul. Pept.*, **2006**; 137 (1-2): 42-9.
- Daniel PB, Kieffer TJ, Leech CA y Habener JF. *Novel alternatively spliced exon in the extracellular ligand-binding domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) selectively increases ligand affinity and alters signal transduction coupling during spermatogenesis*. *J. Biol. Chem.*, **2001**; 276 (16): 12938-44.
- Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M y Kuchroo VK. *IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells*. *Nat. Immunol.*, **2008**; 9 (12): 1347-55.
- Darnay BG y Aggarwal BB. *Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations*. *J. Leukoc. Biol.*, **1997**; 61 (5): 559-66.
- Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL, Van Kaer L, Shi Y y Das G. *Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation*. *J. Exp. Med.*, **2009**; 206 (11): 2407-16.
- Datta S y Sarvetnick NE. *IL-21 limits peripheral lymphocyte numbers through T cell homeostatic mechanisms*. *PLoS One*, **2008**; 3 (9): e3118.
- Dautzenberg FM, Mevenkamp G, Wille S y Hauger RL. *N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants*. *J. Neuroendocrinol.*, **1999**; 11 (12): 941-9.
- Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J y Shevach EM. *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (7): 4022-6.
- de Beaucoudrey L, Puel A, Filipe-Santos O, Cobat A, Ghandil P, Chrabieh M, Feinberg J, von Bernuth H, Samarina A, Jannière L, Fieschi C, Stéphan JL, Boileau C, Lyonnet S, Jondeau G, Cormier-Daire V, Le Merrer M, Hoarau C, Lebranchu Y, Lortholary O, Chandesris MO, Tron F, Gambineri E, Bianchi L, Rodriguez-Gallego C, Zitnik SE, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Marodi L, Chapel H, Reid B, Roifman C, Nadal D, Reichenbach J, Caragol I, Garty BZ, Dogu F, Camcioglu Y, Gülle S, Sanal O, Fischer A, Abel L, Stockinger B, Picard C y Casanova JL. *Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells*. *J. Exp. Med.*, **2008**; 205 (7): 1543-50.
- de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W y Prakken B. *CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis*. *J. Immunol.*, **2004**; 172 (10): 6435-43.
- De la Fuente M, Delgado M y Gomariz RP. *VIP modulation of immune cell functions*. *Adv. Neuroimmunol.*, **1996**; 6 (1): 75-91.
- De la Fuente M, Delgado M, del Rio M, Garrido E, Leceta J, Hernanz A y Gomariz RP. *Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages*. *Peptides*, **1994**; 15 (7): 1157-63.
- De la Fuente M, Delgado M, del Rio M, Martinez C, Hernanz A y Gomariz RP. *Stimulation by vasoactive intestinal peptide (VIP) of*

- phagocytic function in rat macrophages. Protein kinase C involvement. Regul. Pept., **1993**; 48 (3): 345-53.
- de Oliveira Neto M, Ferreira JR Jr, Colau D, Fischer H, Nascimento AS, Craievich AF, Dumoutier L, Renaud JC y Polikarpov I. Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains. Biophys J., **2008**; 94 (5): 1754-65.
- de Pablo P, Dietrich T y McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. J. Rheumatol., **2008**; 35 (1): 70-6.
- Decallonne B, van Etten E, Giulietti A, Casteels K, Overbergh L, Bouillon R y Mathieu C. Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes. J. Autoimmun., **2003**; 20 (3): 219-26.
- Dechanet J, Briolay J, Risoan MC, Chomarat P, Galizzi JP, Banchereau J y Miossec P. IL-4 inhibits growth factor-stimulated rheumatoid synovioocyte proliferation by blocking the early phases of the cell cycle. J. Immunol., **1993**; 151 (9): 4908-17.
- Dejda A, Sokolowska P y Nowak JZ. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. Pharmacol. Rep., **2005**; 57 (3): 307-20.
- Deknuydt F, Bioley G, Valmori D y Ayyoub M. IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. Clin. Immunol., **2009**; 131 (2): 298-307.
- Del Prete GF, de Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M y Romagnani S. Purified protein derivate of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. J. Clin. Invest., **1991**; 88 (1): 346-50.
- Delgado M y Ganea D. Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? J. Immunol., **2001b**; 166 (5): 2907-12.
- Delgado M y Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. J. Immunol., **2001a**; 167 (2): 966-75.
- Delgado M y Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. Arch. Physiol. Biochem., **2001c**; 109 (4): 377-82.
- Delgado M y Ganea D. Inhibition of IFN-gamma-induced janus kinase-1-STAT1 activation in macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. J. Immunol., **2000d**; 165 (6): 3051-7.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit the MEKK1/MEK4/JNK signaling pathway in LPS-stimulated macrophages. J. Neuroimmunol., **2000c**; 110 (1-2): 97-105.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit antigen-induced apoptosis of mature T lymphocytes by inhibiting Fas ligand expression. J. Immunol., **2000a**; 164 (3): 1200-10.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit T cell-mediated cytotoxicity by inhibiting Fas ligand expression. J. Immunol., **2000b**; 165 (1): 114-23.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kappaB and Ets activation. J. Biol. Chem., **1999**; 274 (45): 31930-40.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-8 production in human monocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **2003a**; 301 (4): 825-32.
- Delgado M y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-8 production in human monocytes by downregulating nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., **2003b**; 302 (2): 275-83.
- Delgado M y Ganea D. VIP and PACAP enhance the in vivo generation of memory TH2 cells by inhibiting peripheral deletion of antigen-specific effectors. Arch. Physiol. Biochem., **2001d**; 109 (4): 372-6.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Gomariz RP y Leceta J. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. J. Mol. Med. (Berl.), **2002a**; 80 (1): 16-24.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J y Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. Nat. Med., **2001**; 7 (5): 563-8.
- Delgado M, Chorny A, Gonzalez-Rey E y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide generates CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. J. Leukoc. Biol., **2005a**; 78 (6): 1327-38.
- Delgado M, De la Fuente M, Martinez C y Gomariz RP. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27 and PACAP38) inhibit the mobility of murine thymocytes and splenic lymphocytes: comparison with VIP and implication of cAMP. J. Neuroimmunol., **1995**; 62 (2): 137-46.
- Delgado M, Garrido E, Martinez C, Leceta J y Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP27) and PACAP38 protect CD4+CD8+ thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis. Blood, **1996b**; 87 (12): 5152-61.
- Delgado M, Gonzalez-Rey E y Ganea D. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. J. Immunol., **2005b**; 175 (11): 7311-24.
- Delgado M, Gonzalez-Rey E y Ganea D. VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. FASEB J., **2004b**; 18 (12): 1453-5.
- Delgado M, Jonakait GM y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. Glia, **2002b**; 39 (2): 148-61.
- Delgado M, Leceta J y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promote in vivo generation of memory Th2 cells. FASEB J., **2002c**; 16 (13): 1844-6.
- Delgado M, Leceta J y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. J. Leukoc. Biol., **2003**; 73 (1): 155-64.
- Delgado M, Leceta J, Gomariz RP y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. J. Immunol., **1999b**; 163 (7): 3629-35.
- Delgado M, Leceta J, Sun W, Gomariz RP y Ganea D. VIP and PACAP induce shift to a Th2 response by upregulating B7.2 expression. Ann. N. Y. Acad. Sci., **2000**; 921: 68-78.
- Delgado M, Martinez C, Johnson MC, Gomariz RP y Ganea D. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. J. Neuroimmunol., **1996d**; 68 (1-2): 27-38.
- Delgado M, Martinez C, Leceta J y Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide in thymus: synthesis, receptors and biological actions. Neuroimmunomodulation, **1999a**; 6 (1-2): 97-107.
- Delgado M, Martínez C, Leceta J, Garrido E y Gomariz RP. Differential VIP and VIP1 receptor gene expression in rat thymocyte subsets. Peptides, **1996c**; 17 (5): 803-7.
- Delgado M, Martinez C, Pozo D, Calvo JR, Leceta J, Ganea D y Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. J. Immunol., **1999f**; 162 (2): 1200-5.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF-kappa B and IFN regulatory factor 1 activation. J. Immunol., **1999c**; 162 (8): 4685-96.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP y Ganea D. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages. Subsequent effect on IFN-gamma synthesis by T cells. J. Neuroimmunol., **1999e**; 96 (2): 167-81.
- Delgado M, Munoz-Elias EJ, Kan Y, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE, Gomariz RP y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun. J. Biol. Chem., **1998**; 273 (47): 31427-36.
- Delgado M, Pozo D y Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. Pharmacol. Rev., **2004a**; 56 (2): 249-90.

- Delgado M, Pozo D, Martinez C, Garrido E, Leceta J, Calvo JR y Gomariz RP. Characterization of gene expression of VIP and VIP1-receptor in rat peritoneal lymphocytes and macrophages. *Regul. Pept.*, **1996a**; 62 (2-3): 161-6.
- Delgado M, Reduta A, Sharma V y Ganea D. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. *J. Leukoc. Biol.*, **2004c**; 75 (6): 1122-30.
- Delgado M, Robledo G, Rueda B, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Caro M, Orozco G, Gonzalez-Rey E y Martin J. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum.*, **2008b**; 58 (4): 1010-9.
- Delgado M, Sun W, Leceta J y Ganea D. VIP and PACAP differentially regulate the costimulatory activity of resting and activated macrophages through the modulation of B7.1 and B7.2 expression. *J. Immunol.*, **1999d**; 163 (8): 4213-23.
- Delgado M, Toscano MG, Benabdellah K, Cobo M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E y Martín F. In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2008a**; 58 (4): 1026-37.
- Delgado M. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**; 297 (5): 1181-5.
- Delneste Y, Herbault N, Galea B, Magistrelli G, Bazin I, Bonnefoy JY y Jeannin P. Vasoactive intestinal peptide synergizes with TNF-alpha in inducing human dendritic cell maturation. *J. Immunol.*, **1999**; 163 (6): 3071-5.
- Deng R, Khattar M, Xie A, Schroder PM, He X, Chen W y Stepkowski SM. Anti-TCR mAb induces peripheral tolerance to alloantigens and delays islet allograft rejection in autoimmune diabetic NOD mice. *Transplantation*, **2014**; 97 (12): 1216-24.
- Deng S, Xi Y, Wang H, Hao J, Niu X, Li W, Tao Y y Chen G. Regulatory effect of vasoactive intestinal peptide on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis. *Cell. Immunol.*, **2010**; 265 (2): 105-10.
- Dickson L y Finlayson K. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol. Ther.*, **2009**; 121 (3): 294-316.
- DiLorenzo TP, Graser RT, Ono T, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathenson SG y Serreze DV. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**; 95 (21): 12538-43.
- Ding W, Manni M, Stohl LL, Zhou XK, Wagner JA y Granstein RD. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide and vasoactive intestinal polypeptide bias Langerhans cell Ag presentation toward Th17 cells. *Eur. J. Immunol.*, **2012**; 42 (4): 901-11.
- Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC y Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **1996**; 39 (12): 1961-9.
- Domschke S, Domschke W, Bloom SR, Mitznegg P, Mitchell SJ, Lux G y Strunz U. Vasoactive intestinal peptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. *Gut*, **1978**; 19 (11): 1049-53.
- Donahue KE, Gartlehner G, Jonas DE, Lux LJ, Thieda P, Jonas BL, Hansen RA, Morgan LC y Lohr KN. Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.*, **2008**; 148 (2): 124-34.
- Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.*, **2008**; 8 (5): 337-48.
- Dong W y Zhu P. Functional niche of inflamed synovium for Th17-cell expansion and activation in rheumatoid arthritis: implication to clinical therapeutics. *Autoimmun. Rev.*, **2012**; 11 (12): 844-51.
- Dorsam G y Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VPAC-1) is a novel gene target of the hemolymphopoietic transcription factor Ikaros. *J. Biol. Chem.*, **2002**; 277 (16): 13488-93.
- Dorsam GP, Benton K, Failing J y Batra S. Vasoactive intestinal peptide signaling axis in human leukemia. *World J. Biol. Chem.*, **2011**; 2 (6): 146-60.
- Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Del Prato S, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO y Marchetti P. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**; 104 (12): 5115-20.
- Dotta F, Fondelli C y Falorni A. Can NK cells be a therapeutic target in human type 1 diabetes?. *Eur. J. Immunol.*, **2008**; 38 (11): 2961-3.
- Doucet C, Brouty-Boyé D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW y Azzarone B. IL4 and IL13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblast. *Int. Immunol.*, **1998**; 10 (10): 1421-33.
- Dribek M, Le Potier I, Rodrigues A, Pallandre A, Fattal E y Taverna M. Determination of binding constants of vasoactive intestinal peptide to poly(amidoamine) dendrimers designed for drug delivery using ACE. *Electrophoresis*, **2007**; 28 (13): 2191-200.
- Driver JP, Chen YG y Mathews CE. Comparative genetics: synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes. *Rev. Diabet. Stud.*, **2012**; 9 (4): 169-87.
- Driver JP, Serreze DV y Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin. Immunopathol.*, **2011**; 33 (1): 67-87.
- Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, Li Z, Wu Z y Pei G. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Immunol.*, **2009**; 10 (12): 1252-9.
- Du J, Huang C, Zhou B y Ziegler SF. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J. Immunol.*, **2008**; 180 (7): 4785-92.
- Du K, Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Nicole P y Laburthe M. Human VPAC1 receptor selectivity filter. Identification of a critical domain for restricting secretin binding. *J. Biol. Chem.*, **2002**; 277 (40): 37016-22.
- Du K, Nicole P, Couvineau A y Laburthe M. Aspartate 196 in the first extracellular loop of the human VIP1 receptor is essential for VIP binding and VIP-stimulated cAMP production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**; 230 (2): 289-92.
- Dudler J, Renggli-Zulliger N, Busso N, Lotz M y So A. Effect of interleukin 17 on proteoglycan degradation in murine knee joints. *Ann. Rheum. Dis.*, **2000**; 59 (7): 529-32.
- Dufes C, Gaillard F, Uchegbu IF, Schätzlein AG, Olivier JC y Muller JM. Glucose-targeted niosomes deliver vasoactive intestinal peptide (VIP) to the brain. *Int. J. Pharm.*, **2004**; 285 (1-2): 77-85.
- Dufes C, Olivier JC, Gaillard F, Gaillard A, Couet W y Muller JM. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide (VIP) following nasal administration to rats. *Int. J. Pharm.*, **2003**; 255 (1-2): 87-97.
- Duhen R, Glatigny S, Arbelaez CA, Blair TC, Oukka M y Bettelli E. Cutting edge: the pathogenicity of IFN-gamma-producing Th17 cells is independent of T-bet. *J. Immunol.*, **2013**; 190 (9): 4478-82.
- Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A y Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, **2009**; 10 (8): 857-63.
- Dumoutier L, Lejeune D, Colau D y Renauld JC. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol.*, **2001**; 166 (12): 7090-5.
- Dumoutier L, Louahed J y Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J. Immunol.*, **2000a**; 164 (4): 1814-9.
- Dumoutier L, Van Roost E, Colau D y Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000b**; 97 (18): 10144-9.
- Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, Takahashi H, Sun HW, Kanno Y, Powrie F y O'Shea JJ. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*, **2010**; 32 (5): 605-15.
- Dziurla R, Gaber T, Fangradt M, Hahne M, Tripmacher R, Kolar P, Spies CM, Burmester GR y Buttgerit F. Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4+ T lymphocytes. *Immunol. Lett.*, **2010**; 131 (1): 97-105.

-E-

Egan PJ, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK y Wicks IP. *Promotion of the local differentiation of murine Th17 cells by synovial macrophages during acute inflammatory arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2008**; 58 (12): 3720-9.

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA y Mauri C. *Compromised Function of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis and Reversal by Anti-TNF Therapy*. *J. Exp. Med.*, **2004**; 200 (3): 277-85.

Eizirik DL y Mandrup-Poulsen T. *A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis*. *Diabetologia*, **2001**; 44 (12): 2115-33.

Eizirik DL, Cardozo AK y Cnop M. *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. *Endocr. Rev.*, **2008**; 29 (1): 42-61.

Eizirik DL, Colli ML y Ortis F. *The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes*. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2009**; 5 (4): 219-26.

El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN y Rostami A. *The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF*. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (6): 568-75.

El-Ghani F, Tena-Sempere M y Huhtaniemi I. *Vasoactive intestinal peptide is an important endocrine regulatory factor of fetal rat testicular steroidogenesis*. *Endocrinology*, **1998a**; 139 (4): 1474-80.

El-Ghani F, Tena-Sempere M y Huhtaniemi I. *Vasoactive intestinal peptide stimulates testosterone production by cultured fetal rat testicular cells*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **1998b**; 140 (1-2): 175-8.

Elias KM, Laurence A, Davidson TS, Stephens G, Kanno Y, Shevach EM y O'Shea JJ. *Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway*. *Blood*, **2008**; 111 (3): 1013-20.

Elloso MM, Gomez-Angelats M y Fourie AM. *Targeting the Th17 pathway in psoriasis*. *J. Leukoc. Biol.*, **2012**; 92 (6): 1187-97.

Ely LK, Fischer S y Garcia KC. *Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines*. *Nat. Immunol.*, **2009**; 10 (12): 1245-51.

Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, Bettelli E, Oukka M, van Snick J, Renauld JC, Kuchroo VK y Khoury SJ. *IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106 (31): 12885-90.

Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A y Shapiro AM. *Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice*. *Diabetes*, **2009**; 58 (6): 1302-11.

Ernström U, Gafvelin G y Mutt V. *Rescue of thymocytes from cell death by vasoactive intestinal peptide*. *Regul. Pept.*, **1995**; 57 (2): 99-104.

Etemadi N, Holien JK, Chau D, Dewson G, Murphy JM, Alexander WS, Parker MW, Silke J y Nachbur U. *Lymphotoxin α induces apoptosis, necroptosis and inflammatory signals with the same potency as tumour necrosis factor*. *FEBS J.*, **2013**; 280 (21): 5283-97.

Eyerich S, Eyerich K, Cavani A y Schmidt-Weber C. *IL-17 and IL-22: siblings, not twins*. *Trends Immunol.*, **2010**; 31 (9): 354-61.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB y Cavani A. *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. *J. Clin. Invest.*, **2009**; 119 (12): 3573-85.

-F-

Fahrenkrug J. *VIP and autonomic neurotransmission*. *Pharmacol. Ther.*, **1989**; 41 (3): 515-34.

Falcone M, Lee J, Patstone G, Yeung B y Sarvetnick N. *B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice*. *J. Immunol.*, **1998**; 161 (3): 1163-8.

Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Krah T y Sarvetnick N. *IL-4 triggers autoimmune diabetes by increasing self-antigen presentation within the pancreatic islets*. *Clin. Immunol.*, **2001**; 98 (2): 190-9.

Fallarino F, Grohmann U y Puccetti P. *Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function*. *Eur. J. Immunol.*, **2012**; 42 (8): 1932-7.

Faulkner H, Renauld JC, Van Snick J y Grecis RK. *Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris**. *Infect. Immun.*, **1998**; 66 (8): 3832-40.

Faust A, Rothe H, Schade U, Lampeter E y Kolb H. *Primary nonfunction of islet grafts in autoimmune diabetic nonobese diabetic mice is prevented by treatment with interleukin-4 and interleukin-10*. *Transplantation*, **1996**; 62 (5): 648-52.

Faustman DL y Davis M. *The primacy of CD8 T lymphocytes in type 1 diabetes and implications for therapies*. *J. Mol. Med. (Berl.)*, **2009**; 87 (12): 1173-8.

Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ y McHeyzer-Williams MG. *Follicular helper T cells: lineage and location*. *Immunity*, **2009**; 30 (3): 324-335.

Feili-Hariri M, Falkner DH, Gambotto A, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD y Morel PA. *Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis*. *Hum. Gene Ther.*, **2003**; 14 (1): 13-23.

Feldmann M, Brennan FM y Maini RN. *Rheumatoid arthritis*. *Cell*, **1996a**; 85 (3): 307-10.

Feldmann M, Brennan FM y Maini RN. *Role of cytokines in rheumatoid arthritis*. *Annu. Rev. Immunol.*, **1996b**; 14: 397-440.

Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM y Maini RN. *The role of TNF α and IL-1 in rheumatoid arthritis*. *Curr. Dir. Autoimmun.*, **2001**; 3: 188-99.

Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA y Livnat S. *Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue*. *J. Immunol.*, **1985**; 135 (2 Suppl.): 755s-65s.

Fernandez-Martin A, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Ganea D y Delgado M. *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Eur. J. Immunol.*, **2006b**; 36 (2): 318-26.

Fernandez-Martin A, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Martin J, Pozo D, Ganea D y Delgado M. *VIP prevents experimental multiple sclerosis by downregulating both inflammatory and autoimmune components of the disease*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2006a**; 1070: 276-81.

Fernandez-Montesinos R, Castillo PM, Klippstein R, Gonzalez-Rey E, Mejias JA, Zaderenko AP y Pozo D. *Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles*. *Nanomedicine (Lond.)*, **2009**; 4 (8): 919-930.

Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, Nano R, Olek S, Maffi P, Scavini M, Secchi A, Staudacher C, Bonifacio E y Battaglia M. *Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes*. *Diabetes*, **2011**; 60 (11): 2903-13.

Feuerer M, Shen Y, Littman DR, Benoist C y Mathis D. *How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets*. *Immunity*, **2009**; 31 (4): 654-64.

Filipsson K, Sundler F, Hannibal J y Åhrén B. *PACAP and PACAP receptors in insulin producing tissues: localization and effects*. *Regul. Pept.*, **1998**; 74 (2-3): 167-75.

Finch RJ, Sreedharan SP y Goetzl EJ. *High-affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human myeloma cells*. *J. Immunol.*, **1989**; 142 (6): 1977-81.

Fink JS, Verhave M, Kasper S, Tsukada T, Mandel G y Goodman RH. *The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**; 85 (18): 6662-6.

Fink T y Weihe E. *Multiple neuropeptides in nerves supplying mammalian lymph nodes: messenger candidates for sensory and autonomic neuroimmunomodulation?*. *Neurosci. Lett.*, **1988**; 90 (1-2): 39-44.

Firestein GS. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. *Nature*, **2003**; 423 (6937): 356-61.

Flodström M, Maday A, Balakrishna D, Cleary MM, Yoshimura A y Sarvetnick N. *Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection*. *Nat. Immunol.*, **2002**; 3 (4): 373-82.

Fontenot JD, Gavin MA, y Rudensky AY. *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat. Immunol.*, **2003**; 4 (4): 330-6.

- Forlow SB, Schurr JR, Kolls JK, Bagby GJ, Schwarzenberger PO y Ley K. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood*, **2001**; 98 (12): 3309-14.
- Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM y Rennick DM. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies *in vivo*. *Immunity*, **2001**; 15 (6): 985-95.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J y Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.*, **1996**; 183 (6): 2593-603.
- Foster N, Lea SR, Preshaw PM y Taylor JJ. Pivotal advance: vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocyte TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **2007**; 81 (4): 893-903.
- Fox CJ y Danska JS. IL-4 expression at the onset of islet inflammation predicts nondestructive insulinitis in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, **1997**; 158 (5): 2414-24.
- Freeman AF y Holland SM. The hyper-IgE syndromes. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, **2008**; 28 (2): 277-91.
- Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A y Bräuer R. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res. Ther.*, **2005**; 7 (2): R291-301.
- Fry DC, Madison VS, Bolin DR, Greeley DN, Toome V y Wegrzynski BB. Solution structure of an analogue of vasoactive intestinal peptide as determined by two-dimensional NMR and circular dichroism spectroscopies and constrained molecular dynamics. *Biochemistry*, **1989**; 28 (6): 2399-409.
- Fujieda S, Waschek JA, Zhang K y Saxon A. Vasoactive intestinal peptide induces S(alpha)/S(mu) switch circular DNA in human B cells. *J. Clin. Invest.*, **1996**; 98 (7): 1527-32.
- Fujihira K, Nagata M, Moriyama H, Yasuda H, Arisawa K, Nakayama M, Maeda S, Kasuga M, Okumura K, Yagita H y Yokono K. Suppression and acceleration of autoimmune diabetes by neutralization of endogenous interleukin-12 in NOD mice. *Diabetes*, **2000**; 49 (12): 1998-2006.
- Fujimori N, Oono T, Igarashi H, Ito T, Nakamura T, Uchida M, Coy DH, Jensen RT y Takayanagi R. Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase. *Peptides*, **2011**; 32 (10): 2067-76.
- Fujimoto M, Serada S, Mihara M, Uchiyama Y, Yoshida H, Koike N, Ohsugi Y, Nishikawa T, Ripley B, Kimura A, Kishimoto T y Naka T. Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheum.*, **2008**; 58 (12): 3710-9.
- Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J. Dermatol. Sci.*, **2013**; 72 (1): 3-8.
- Furness SG, Wootton D, Christopoulos A y Sexton PM. Consequences of splice variation on Secretin family G protein-coupled receptor function. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**; 166 (1): 98-109.
- G-
- Gabay C y McInnes IB. The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.*, **2009**; 11 (3): 230.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.*, **2009**; 9 (8): 556-67.
- Ganea D y Sun L. Vasoactive intestinal peptide downregulates the expression of IL-2 but not of IFN gamma from stimulated murine T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.*, **1993**; 47 (2): 147-58.
- Ganjalikhan Hakemi M, Ghaedi K, Andalib A, Hosseini M y Rezaei A. Optimization of human Th17 cell differentiation *in vitro*: evaluating different polarizing factors. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **2011**; 47 (8): 581-92.
- Gao X, Wu B, Zhang Q, Chen J, Zhu J, Zhang W, Rong Z, Chen H y Jiang X. Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. *J. Control Release*, **2007**; 121 (3): 156-67.
- García-Fernández MO, Collado B, Bodega G, Cortes J, Ruiz-Villaspesa A, Carmena MJ y Prieto JC. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol. Endocrinol.*, **2005**; 20 (6): 327-33.
- Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renaud JC y Matthys P. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum.*, **2009**; 60 (2): 390-5.
- Genovese MC, Durez P, Richards HB, Supronik J, Dokoupilova E, Mazurov V, Aelion JA, Lee SH, Coddling CE, Kellner H, Ikawa T, Hugot S y Mpofu S. Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study. *Ann. Rheum. Dis.*, **2013**; 72 (6): 863-9.
- Genovese MC, Van den Bosch F, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P y Sloan-Lancaster J. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.*, **2010**; 62 (4): 929-39.
- Germann T, Szeliga J, Hess H, Störkel S, Podlaski FJ, Gately MK, Schmitt E y Rüde E. Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**; 92 (11): 4823-7.
- Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Hirahara K y O'Shea JJ. T helper 17 cell heterogeneity and pathogenicity in autoimmune disease. *Trends Immunol.*, **2011**; 32 (9): 395-401.
- Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W y O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature*, **2010**; 467 (7318): 967-71.
- Giordanetto F, Revell JD, Knerr L, Hostettler M, Paunovic A, Priest C, Janefeldt A y Gill A. Stapled Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Derivatives Improve VPAC2 Agonism and Glucose-Dependent Insulin Secretion. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2013**; 4 (12): 1163-8.
- Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jailwala P, Jana S, Khoo HJ, Albertz H, Woodliff J, Koppen M, Alemzadeh R, Hagopian W y Ghosh S. At-risk and recent-onset type 1 diabetic subjects have increased apoptosis in the CD4+CD25+ T-cell fraction. *PLoS One*, **2007**; 2 (1): e146.
- Glowa JR, Panlilio LV, Brennehan DE, Gozes I, Fridkin M y Hill JM. Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist. *Brain Res.*, **1992**; 570 (1-2): 49-53.
- Goetzl EJ, Kodama KT, Turck CW, Schiögolev SA y Sreedharan SP. Unique pattern of cleavage of vasoactive intestinal peptide by human lymphocytes. *Immunology*, **1989**; 66 (4): 554-8.
- Goldberg M, Nativ O, Luknar-Gabor N, Agar G, Beer Y y Katz Y. Synergism between tumor necrosis factor alpha and interleukin-17 to induce IL-23 p19 expression in fibroblast-like synoviocytes. *Mol. Immunol.*, **2009**; 46 (8-9): 1854-9.
- Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, **2003**; 42 Suppl 2: ii11-6.
- Goldring SR. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Immunol.*, **2002**; 14 (4): 406-10.
- Gololobov G, Noda Y, Sherman S, Rubinstein I, Baranowska-Kortylewicz J y Paul S. Stabilization of vasoactive intestinal peptide by lipids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**; 285 (2): 753-8.
- Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martínez C, Rosignoli F, García-Gómez M, Leceta J y Juarranz Y. Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *J. Leukoc. Biol.*, **2005**; 78 (2): 491-502.
- Gomariz RP, Arranz A, Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, García-Gómez M, Leceta J y Martínez C. Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1825-32.
- Gomariz RP, De La Fuente M, Hernanz A y Leceta J. Occurrence of vasoactive intestinal peptide (VIP) in lymphoid organs from rat and mouse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1992**; 650: 13-8.
- Gomariz RP, Delgado M, Naranjo JR, Mellström B, Tormo A, Mata F y Leceta J. VIP gene expression in rat thymus and spleen. *Brain Behav. Immun.*, **1993**; 7 (4): 271-8.

- Gomariz RP, Garrido E, Leceta J, Martínez C, Abalo R y Delgado M. *Gene expression of VIP receptor in rat lymphocytes*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **1994**; 203 (3): 1599-604.
- Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Arranz A, Carrión M, Juarranz Y, Leceta J y Martínez C. *Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics*. Curr. Pharm. Des., **2010**; 16 (9): 1063-80.
- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J y Martínez C. *VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **2006**; 1070: 51-74.
- Gomariz RP, Leceta J, Garrido E, Garrido T y Delgado M. *Vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA expression in rat T and B lymphocytes*. Regul. Pept., **1994**; 50 (2): 177-84.
- Gomariz RP, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Vicente A y Zapata AG. *Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus*. Brain Behav. Immun., **1990**; 4 (2): 151-61.
- Gomariz RP, Martínez C, Abad C, Leceta J y Delgado M. *Immunology of VIP: a review and therapeutic perspectives*. Curr. Pharm. Des., **2001**; 7 (2): 89-111.
- Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C y Hajeer AH. *Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis*. Semin. Arthritis Rheum., **2002**; 31 (6): 355-60.
- Gonzalez-Rey E y Delgado M. *Therapeutic treatment of experimental colitis with regulatory dendritic cells generated with vasoactive intestinal peptide*. Gastroenterology, **2006**; 131 (6): 1799-811.
- Gonzalez-Rey E y Delgado M. *Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells*. Brain Behav. Immun., **2008**; 22 (1): 35-41.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, Ganea D y Delgado M. *Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells*. Blood, **2006a**; 107 (9): 3632-8.
- Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A y Delgado M. *Vasoactive intestinal peptide induces CD4⁺, CD25⁺ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum., **2006b**; 54 (3): 864-76.
- Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Chorny A, Martin J, Pozo D, Ganea D y Delgado M. *Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses*. Am. J. Pathol., **2006c**; 168 (4): 1179-88.
- Goossens JF, Pommery N, Lohez M, Pommery J, Helbecque N, Cotelle P, Lhermitte M y Henichart JP. *Antagonistic effect of a vasoactive intestinal peptide fragment, vasoactive intestinal peptide(1-11), on guinea pig trachea smooth muscle relaxation*. Mol. Pharmacol., **1992**; 41 (1): 104-9.
- Gottenberg JE, Dayer JM, Lukas C, Ducot B, Chiocchia G, Cantagrel A, Saraux A, Roux-Lombard P y Mariette X. *Serum IL-6 and IL-21 are associated with markers of B cell activation and structural progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort*. Ann. Rheum. Dis., **2012**; 71 (7): 1243-8.
- Gottschall PE, Tatsuno I y Arimura A. *Hypothalamic binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: characterization and molecular identification*. FASEB J., **1991**; 5 (2): 194-9.
- Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M y Robberecht P. *In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor*. Peptides, **1997d**; 18 (10): 1555-60.
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P y Deschodt-Lanckman M. *Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11*. Biochem. Pharmacol., **1997a**; 54 (4): 509-15.
- Gourlet P, Vandermeers A, Vertongen P, Rathe J, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M y Robberecht P. *Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists*. Peptides, **1997b**; 18 (10): 1539-45.
- Gourlet P, Vandermeers-Piret MC, Rathé J, De Neef P, Cnudde J, Robberecht P y Waelbroeck M. *Vasoactive intestinal peptide modification at position 22 allows discrimination between receptor subtypes*. Eur. J. Pharmacol., **1998**; 348 (1): 95-9.
- Gourlet P, Vertongen P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathé J, De Neef P, Waelbroeck M y Robberecht P. *The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist RO 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass*. Peptides, **1997c**; 18 (3): 403-8.
- Gozes I y Brenneman DE. *A new concept in the pharmacology of neuroprotection*. J. Mol. Neurosci., **2000**; 14 (1-2): 61-8.
- Gozes I, Bodner M, Shani Y y Fridkin M. *Structure and expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor*. Peptides, **1986**; 7 Suppl. 1: 1-6.
- Gozes I, Bodner M, Shwartz H, Shani Y y Fridkin M. *Studies toward the biosynthesis of vasoactive intestinal peptide (VIP)*. Peptides, **1984**; 5 (2): 161-6.
- Gozes I, Fridkin M, Hill JM y Brenneman DE. *Pharmaceutical VIP: prospects and problems*. Curr. Med. Chem., **1999**; 6 (11): 1019-34.
- Graeber KE y Olsen NJ. *Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity*. Inflamm. Res., **2012**; 61 (2): 87-96.
- Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M y Rostami A. *IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination*. J. Immunol., **2002**; 169 (12): 7104-10.
- Greeley SA, Moore DJ, Noorchashm H, Noto LE, Rostami SY, Schlachterman A, Song HK, Koeberlein B, Barker CF y Naji A. *Impaired activation of islet-reactive CD4 T cells in pancreatic lymph nodes of B cell-deficient nonobese diabetic mice*. J. Immunol., **2001**; 167 (8): 4351-7.
- Gregersen PK, Silver J y Winchester RJ. *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum., **1987**; 30 (11): 1205-13.
- Gregg RK, Jain R, Schoenleber SJ, Divekar R, Bell JJ, Lee HH, Yu P y Zaghouani H. *A sudden decline in active membrane-bound TGF-beta impairs both T regulatory cell function and protection against autoimmune diabetes*. J. Immunol., **2004**; 173 (12): 7308-16.
- Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, Miller JA, O'Connell AC y Puck JM. *Hyper-IgE syndrome with recurrent infections—an autosomal dominant multisystem disorder*. N. Engl. J. Med., **1999**; 340 (9): 692-702.
- Groneberg DA, Hartmann P, Dinh QT y Fischer A. *Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(2) mRNA in human airways*. Lab. Invest., **2001b**; 81 (5): 749-55.
- Groneberg DA, Springer J y Fischer A. *Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma*. Pulm. Pharmacol. Ther., **2001a**; 14 (5): 391-401.
- Grötzinger J. *Molecular mechanisms of cytokine receptor activation*. Biochim. Biophys. Acta, **2002**; 1592 (3): 215-23.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE y Roncarolo MG. *A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, **1997**; 389 (6652): 737-42.
- Gu C, Wu L y Li X. *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. Cytokine, **2013**; 64 (2): 477-85.
- Guan CX, Zhang M, Qin XQ, Cui YR, Luo ZQ, Bai HB y Fang X. *Vasoactive intestinal peptide enhances wound healing and proliferation of human bronchial epithelial cells*. Peptides, **2006**; 27 (12): 3107-14.
- Guerrero JM, Prieto JC, Elorza FL, Ramirez R y Goberna R. *Interaction of vasoactive intestinal peptide with human blood mononuclear cells*. Mol. Cell. Endocrinol., **1981**; 21 (2): 151-60.
- Guggino G, Giardina A, Ferrante A, Giardina G, Schinocca C, Sireci G, Dieli F, Ciccia F y Triolo G. *The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis*. Rheumatol. Int., **2014** May 3. [Epub ahead of print]
- Guidone G, Müller D, Vogt K y Mukhopadhyay AK. *Characterization of VIP and PACAP receptors in cultured rat penis corpus cavernosum smooth muscle cells and their interaction with guanylate cyclase-B receptors*. Regul. Pept., **2002**; 108 (2-3): 63-72.
- Guijarro LG, Rodríguez-Pena MS y Prieto JC. *Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in rat seminal vesicle*. Am. J. Physiol., **1991**; 260 (2 Pt 1): E286-91.
- Gülçür E, Thağı M, Khaja F, Kuzmis A y Onyüksel H. *Curcumin in VIP-targeted sterically stabilized phospholipid nanomicelles: a novel*

- therapeutic approach for breast cancer and breast cancer stem cells. *Drug Deliv. Transl. Res.*, **2013**; 3 (6).
- Guo L, Wei G, Zhu J, Liao W, Leonard WJ, Zhao K y Paul W. *IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106 (32): 13463-8.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz MG, Collado B, Rodríguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC y Carmena MJ. *Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K*. *Prostate*, **2005**; 63 (1): 44-55.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martínez C, Galindo M, Payá M, Gomariz RP y Pablos JL. *VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts*. *Rheumatology (Oxford)*, **2006**; 45 (5): 527-32.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL y Leceta J. *Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: implications for rheumatoid arthritis*. *Brain Behav. Immun.*, **2008**; 22 (3): 312-7.
- Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Bolaños O, Carmena MJ, Prieto JC y Juarranz MG. *VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal*. *Br. J. Pharmacol.*, **2003**; 139 (5): 1050-8.
- H-
- Habib T, Senadheera S, Weinberg K y Kaushansky K. *The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3*. *Biochemistry*, **2002**; 41 (27): 8725-31.
- Hafström I, Ringertz B, Lundberg T y Palmblad J. *The effect of endothelin, neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide and substance P on neutrophil functions*. *Acta Physiol. Scand.*, **1993**; 148 (3): 341-6.
- Haghjoo K, Cash PW, Farid RS, Komisaruk BR, Jordan F y Pochapsky SS. *Solution structure of vasoactive intestinal polypeptide (11-28)-NH₂, a fragment with analgesic properties*. *Pept. Res.*, **1996**; 9 (6): 327-31.
- Hahm SH y Eiden LE. *Cis-regulatory elements controlling basal and inducible VIP gene transcription*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1998a**; 865: 10-26.
- Hahm SH y Eiden LE. *Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene*. *J. Biol. Chem.*, **1998b**; 273 (27): 17086-94.
- Hahm SH y Eiden LE. *Tissue-specific expression of the vasoactive intestinal peptide gene requires both an upstream tissue specifier element and the 5' proximal cyclic AMP-responsive element*. *J. Neurochem.*, **1996**; 67 (5): 1872-81.
- Hahm SH y Eiden LE. *Two separate cis-active elements of the vasoactive intestinal peptide gene mediate constitutive and inducible transcription by binding different sets of AP-1 proteins*. *J. Biol. Chem.*, **1999**; 274 (36): 25588-93.
- Hajos F, Stark B, Hensler S, Prassl R y Mosgoeller W. *Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide*. *Int. J. Pharm.*, **2008**; 357 (1-2): 286-94.
- Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, Gibson K, Pile K, Wordsworth BP y Jessop JD. *Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis*. *QJM*, **1996**; 89 (11): 821-9.
- Hamelink C, Hahm SH, Huang H y Eiden LE. *A restrictive element 1 (RE-1) in the VIP gene modulates transcription in neuronal and non-neuronal cells in collaboration with an upstream tissue specifier element*. *J. Neurochem.*, **2004**; 88 (5): 1091-101.
- Han D, Xu X, Baidal D, Leith J, Ricordi C, Alejandro R y Kenyon NS. *Assessment of cytotoxic lymphocyte gene expression in the peripheral blood of human islet allograft recipients: elevation precedes clinical evidence of rejection*. *Diabetes*, **2004**; 53 (9): 2281-90.
- Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB y Lawrence DA. *CD4+CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis*. *Cell. Immunol.*, **2008**; 253 (1-2): 92-101.
- Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N y Weiner HL. *Suppression of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and -10, transforming growth factor-beta, and prostaglandin-E*. *Am. J. Pathol.*, **1995**; 147 (5): 1193-9.
- Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S y Kolls JK. *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.*, **2005**; 202 (6): 761-9.
- Haque UJ y Bartlett SJ. *Relationships among vitamin D, disease activity, pain and disability in rheumatoid arthritis*. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **2010**; 28 (5): 745-7.
- Harikumar KG, Morfis MM, Lisenbee CS, Sexton PM y Miller LJ. *Constitutive formation of oligomeric complexes between family B G protein-coupled vasoactive intestinal polypeptide and secretin receptors*. *Mol. Pharmacol.*, **2006**; 69 (1): 363-73.
- Harmar A. J. *Family-B G-protein-coupled receptors*. *Genome Biol.*, **2001**; 2 (12): REVIEWS3013.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA y Waschek JA. *International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. *Pharmacol. Rev.*, **1998**; 50 (2): 265-70.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA y Said SI. *Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1*. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**; 166 (1): 4-17.
- Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Guggen M y Reubi JC. *Distribution of the VPAC2 receptor in peripheral tissues of the mouse*. *Endocrinology*, **2004**; 145 (3): 1203-10.
- Harmar AJ. *An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei*. *J. Neuroendocrinol.*, **2003**; 15 (4): 335-8.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM y Weaver CT. *Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. *Nat. Immunol.*, **2005**; 6 (11): 1123-32.
- Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM y Drake CG. *Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity*. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (7): 4313-7.
- Hartuppe J, Liu C, Novotny M, Li X y Hamilton T. *IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization*. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (6): 4135-41.
- Haseda F, Imagawa A, Murase-Mishiba Y, Terasaki J y Hanafusa T. *CD4⁺ CD45RA⁻ FoxP3^{high} activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes*. *Clin. Exp. Immunol.*, **2013**; 173 (2): 207-16.
- Hashimoto H, Nogi H, Mori K, Ohishi H, Shigemoto R, Yamamoto K, Matsuda T, Mizuno N, Nagata S y Baba A. *Distribution of the mRNA for a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor in the rat brain: an in situ hybridization study*. *J. Comp. Neurol.*, **1996**; 371 (4): 567-77.
- Hashimoto H, Ogawa N, Hagihara N, Yamamoto K, Imanishi K, Nogi H, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Nagata S y Baba A. *Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and activation*. *Mol. Pharmacol.*, **1997**; 52 (1): 128-35.
- Hashizume M, Hayakawa N y Mihara M. *IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17*. *Rheumatology (Oxford)*, **2008**; 47 (11): 1635-40.
- Haskins K y Cooke A. *CD4 T cells and their antigens in the pathogenesis of autoimmune diabetes*. *Curr. Opin. Immunol.*, **2011**; 23 (6): 739-45.
- Hatipoglu U, Gao X, Verral S, Séjourné F, Pitrak D, Alkan-Onyüskel H y Rubinstein I. *Sterically stabilized phospholipids attenuate human neutrophils chemotaxis in vitro*. *Life Sci.*, **1998**; 63 (8): 693-9.
- Haudenschild D, Moseley T, Rose L y Reddi AH. *Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer*. *J. Biol. Chem.*, **2002**; 277 (6): 4309-16.
- Haufe S, Haug M, Schepp C, Kuemmerle-Deschner J, Hansmann S, Rieber N, Tzaribachev N, Hospach T, Maier J, Dannecker GE y Holzer U. *Impaired suppression of synovial fluid CD4+CD25⁺ T cells from patients*

- with juvenile idiopathic arthritis by CD4+CD25+ Treg cells. *Arthritis Rheum.*, **2011**; 63 (10): 3153-62.
- Hausmann DH, Yu B, Hausmann S y Wucherpfennig KW. pH-dependent peptide binding properties of the type I diabetes-associated I-Ag7 molecule: rapid release of CLIP at an endosomal pH. *J. Exp. Med.*, **1999**; 189 (11): 1723-34.
- He YW, Deftos ML, Ojala EW y Bevan MJ. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity*, **1998**; 9 (6): 797-806.
- Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Fröhlich A, Bergthaler A, Flatz L, Pinschewer DD, Radbruch A y Löhning M. Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3+T-bet+ Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Immunity*, **2010**; 32 (1): 116-28.
- Heliövaara M, Aho K, Knekt P, Impivaara O, Reunanen A y Aromaa A. Coffee consumption, rheumatoid factor, and the risk of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **2000**; 59 (8): 631-5.
- Henle F, Fischer C, Meyer DK y Leemhuis J. Vasoactive intestinal peptide and PACAP38 control N-methyl-D-aspartic acid-induced dendrite motility by modifying the activities of Rho GTPases and phosphatidylinositol 3-kinases. *J. Biol. Chem.*, **2006**; 281 (34): 24955-69.
- Henney CS, Bourne HR y Lichtenstein LM. The role of cyclic 3',5' adenosine monophosphate in the specific cytolytic activity of lymphocytes. *J. Immunol.*, **1972**; 108 (6): 1526-34.
- Henning RJ y Sawmiller DR. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc. Res.*, **2001**; 49 (1): 27-37.
- Henriques A, Gomes V, Duarte C, Pedreiro S, Carvalheiro T, Areias M, Caseiro A, Gabriel AJ, Laranjeira P, Pais ML, da Silva JA y Paiva A. Distribution and functional plasticity of peripheral blood Th(c)17 and Th(c)1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.*, **2013**; 33 (8): 2093-9.
- Herberman RB y Ortaldo JR. Natural killer cells: their roles in defenses against disease. *Science*, **1981**; 214 (4516): 24-30.
- Heremans H, Dillen C, Groenen M, Matthys P y Billiau A. Role of endogenous interleukin-12 (IL-12) in induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur. Cytokine Netw.*, **1999**; 10 (2): 171-80.
- Herman AE, Freeman GJ, Mathis D y Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.*, **2004**; 199 (11): 1479-89.
- Hernández-Santos N y Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host. Microbe.*, **2012**; 11 (5): 425-35.
- Herrera JL, Fernández-Montesinos R, González-Rey E, Delgado M y Pozo D. Protective role for plasmid DNA-mediated VIP gene transfer in non-obese diabetic mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2006**; 1070: 337-41.
- Hickman-Brecks CL, Racz JL, Meyer DM, LaBranche TP y Allen PM. Th17 cells can provide B cell help in autoantibody induced arthritis. *J. Autoimmun.*, **2011**; 36 (1): 65-75.
- Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC y Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J. Immunol.*, **2006**; 177 (11): 7980-9.
- Hill NJ, Lyons PA, Armitage N, Todd JA, Wicker LS y Peterson LB. NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM1 and NRAMP1 loci in humans. *Diabetes*, **2000**; 49 (10): 1744-7.
- Hill NJ, Van Gunst K y Sarvetnick N. Th1 and Th2 pancreatic inflammation differentially affects homing of islet-reactive CD4 cells in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, **2003**; 170 (4): 1649-58.
- Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Kanno Y y O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2010**; 21 (6): 425-34.
- Hirahara K, Vahedi G, Ghoreschi K, Yang XP, Nakayama S, Kanno Y, O'Shea JJ y Laurence A. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology*, **2011**; 134 (3): 235-45.
- Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ y Stockinger B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (3): 255-63.
- Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N y Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.*, **2007b**; 204 (1): 41-7.
- Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM y Stockinger B. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat. Immunol.*, **2013**; 14 (4): 372-9.
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N y Sakaguchi S. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.*, **2007a**; 204 (12): 2803-12.
- Hirschlick RE, Glassroth J, Jordan MC, Wilcosky TC, Wallace JM, Kvale PA, Markowitz N, Rosen MJ, Mangura BT y Hopewell PC. Bacterial pneumonia in persons infected with the human immunodeficiency virus. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *N. Engl. J. Med.*, **1995**; 333 (13): 845-51.
- Hoechst B, Gamrekashvili J, Manns MP, Greten TF y Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood*, **2011**; 117 (24): 6532-41.
- Hoefig KP y Heissmeyer V. MicroRNAs grow up in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, **2008**; 20 (3): 281-7.
- Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson JL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JC, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM y Grimbacher B. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **2007**; 357 (16): 1608-19.
- Holtmann MH, Hadac EM y Miller LJ. Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *Studies of chimeric receptors. J. Biol. Chem.*, **1995**; 270 (24): 14394-8.
- Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, Knip M, Otonkoski T y Vaarala O. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J. Immunol.*, **2010**; 185 (3): 1959-67.
- Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, Canè S, Frizziero L y Facchini A. High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*, **2001**; 40 (5): 522-7.
- Honorati MC, Neri S, Cattini L y Facchini A. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*, **2006**; 14 (4): 345-52.
- Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W y Lubkowski J. The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J. Biol. Chem.*, **2002**; 277 (40): 37647-54.
- Hör S, Pirzer H, Dumoutier L, Bauer F, Wittmann S, Sticht H, Renauld JC, de Waal Malefyt R y Fickenscher H. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J. Biol. Chem.*, **2004**; 279 (32): 33343-51.
- Hori S, Nomura T y Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, **2003**; 299 (5609): 1057-61.
- Horiki M, Yamato E, Noso S, Ikegami H, Ogihara T y Miyazaki J. High-level expression of interleukin-4 following electroporation-mediated gene transfer accelerates Type 1 diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.*, **2003**; 20 (2): 111-7.
- Horwitz DA. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis Res. Ther.*, **2008**; 10 (6): 227.
- Hosoya M, Onda H, Ogi K, Masuda Y, Miyamoto Y, Ohtaki T, Okazaki H, Arimura A y Fujino M. Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**; 194 (1): 133-43.
- Hot A y Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.*, **2011**; 70 (5): 727-32.
- Hot A, Zrioual S, Lenief V y Miossec P. IL-17 and tumour necrosis factor a combination induces a HIF-1a-dependent invasive phenotype in synoviocytes. *Ann. Rheum. Dis.*, **2012**; 71 (8): 1393-401.

- Hot A, Zrioual S, Toh ML, Lenief V y Miossec P. *IL-17A- versus IL-17F-induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in rheumatoid synoviocytes*. *Ann. Rheum. Dis.*, **2011**; 70 (2): 341-8.
- Howson JM, Walker NM, Clayton D, Todd JA y Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A*. *Diabetes Obes. Metab.*, **2009**; 11 Suppl 1: 31-45.
- Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, Yi J, Guentert T, Tousson A, Stanus AL, Le TV, Lorenz RG, Xu H, Kolls JK, Carter RH, Chaplin DD, Williams RW y Mountz JD. *Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice*. *Nat. Immunol.*, **2008**; 9 (2): 166-75.
- Huang MC, Watson SR, Liao JJ y Goetzl EJ. *Th17 augmentation in OTII TCR plus T cell-selective type 1 sphingosine 1-phosphate receptor double transgenic mice*. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (11): 6806-13.
- Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N y Stewart TA. *Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes*. *Diabetes*, **1995**; 44 (6): 658-64.
- Huber M, Brüstle A, Reinhard K, Guralnik A, Walter G, Mahiny A, von Löw E y Lohoff M. *IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**; 105 (52): 20846-51.
- Huber S, Gagliani N y Flavell RA. *Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine*. *Eur. J. Immunol.*, **2012**; 42 (9): 2238-45.
- Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'Connor W Jr, Huber FJ, Chaudhry A, Kamanaka M, Kobayashi Y, Booth CJ, Rudensky AY, Roncarolo MG, Battaglia M y Flavell RA. *Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner*. *Immunity*, **2011**; 34 (4): 554-65.
- Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, Antoni C, Draeos Z, Gold MH; Psoriasis Study Group, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ; Rheumatoid Arthritis Study Group, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD; Uveitis Study Group, Rose K, Haider A y Di Padova F. *Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis*. *Sci. Transl. Med.*, **2010**; 2 (52): 52ra72.
- Huh JR, Leung MW, Huang P, Ryan DA, Krout MR, Malapaka RR, Chow J, Manel N, Ciofani M, Kim SV, Cuesta A, Santori FR, Lafaille JJ, Xu HE, Gin DY, Rastinejad F y Littman DR. *Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity*. *Nature*, **2011**; 472 (7344): 486-90.
- Hussein YM, El-Shal AS, Rezk NA, Abdel Galil SM y Alzahrani SS. *Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population*. *Cytokine*, **2013**; 61 (3): 849-55.
- Hutchings P, Rosen H, O'Reilly L, Simpson E, Gordon S y Cooke A. *Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages*. *Nature*, **1990**; 348 (6302): 639-42.
- Hwang ES. *Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation*. *Yonsei Med. J.*, **2010**; 51 (4): 484-91.
- Hwang SY y Kim HY. *Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients*. *Mol. Cells*, **2005**; 19 (2): 180-4.
- Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU y Kim HY. *IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways*. *Arthritis Res. Ther.*, **2004**; 6 (2): R120-8.
- Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM y Starovasnik MA. *IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding*. *EMBO J.*, **2001**; 20 (19): 5332-41.
- I-
- Ichikawa S, Sreedharan SP, Goetzl EJ y Owen RL. *Immunohistochemical localization of peptidergic nerve fibers and neuropeptide receptors in Peyer's patches of the cat ileum*. *Regul. Pept.*, **1994**; 54 (2-3): 385-95.
- Ichinose M, Sawada M y Maeno T. *Inhibitory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on phagocytosis in mouse peritoneal macrophages*. *Regul. Pept.*, **1994**; 54 (2-3): 457-66.
- Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, Takaesu G, Hori S, Yoshimura A y Kobayashi T. *Foxp3 inhibits ROR γ mat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ mat*. *J. Biol. Chem.*, **2008**; 283 (25): 17003-8.
- Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ y Kopf M. *CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4⁺ T cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106 (3): 876-81.
- Igarashi H, Ito T, Mantey SA, Pradhan TK, Hou W, Coy DH y Jensen RT. *Development of simplified vasoactive intestinal peptide analogs with receptor selectivity and stability for human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**; 315 (1): 370-81.
- Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitsu A y Iwakura Y. *Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- β -induced Foxp3 expression*. *J. Immunol.*, **2014**; 192 (4): 1449-58.
- Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K y Nojima Y. *Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine*. *Arthritis Rheum.*, **2005**; 52 (4): 1037-46.
- Ikezaki H, Onyüksel H y Rubinstein I. *Liposomal VIP attenuates phenylephrine- and ANG II-induced vasoconstriction in vivo*. *Am. J. Physiol.*, **1998a**; 275 (2 Pt 2): R588-95.
- Ikezaki H, Paul S, Alkan-Onyüksel H, Patel M, Gao XP y Rubinstein I. *Vasodilation elicited by liposomal VIP is unimpeded by anti-VIP antibody in hamster cheek pouch*. *Am. J. Physiol.*, **1998b**; 275 (1 Pt 2): R56-62.
- Inagaki N, Yoshida H, Mizuta M, Mizuno N, Fujii Y, Gonoi T, Miyazaki J y Seino S. *Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**; 91 (7): 2679-83.
- Irmiler IM, Gajda M y Bräuer R. *Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response*. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (9): 6228-36.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C y Iwakura Y. *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses*. *Immunity*, **2009**; 30 (1): 108-19.
- Ishigame H, Zenewicz LA, Sanjabi S, Licona-Limón P, Nakayama M, Leonard WJ y Flavell RA. *Excessive Th1 responses due to the absence of TGF- β signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**; 110 (17): 6961-6.
- Ishiguro A, Akiyama T, Adachi H, Inoue J y Nakamura Y. *Therapeutic potential of anti-interleukin-17A aptamer: suppression of interleukin-17A signaling and attenuation of autoimmunity in two mouse models*. *Arthritis Rheum.*, **2011**; 63 (2): 455-66.
- Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K y Nagata S. *Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide*. *Neuron*, **1992**; 8 (4): 811-9.
- Ishioka C, Yoshida A, Kimata H y Mikawa H. *Vasoactive intestinal peptide stimulates immunoglobulin production and growth of human B cells*. *Clin. Exp. Immunol.*, **1992**; 87 (3): 504-8.
- Itoh N, Obata K, Yanaihara N y Okamoto H. *Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27*. *Nature*, **1983**; 304 (5926): 547-9.
- Itri J y Colwell CS. *Regulation of inhibitory synaptic transmission by vasoactive intestinal peptide (VIP) in the mouse suprachiasmatic nucleus*. *J. Neurophysiol.*, **2003**; 90 (3): 1589-97.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K y Littman DR. *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. *Cell*, **2009**; 139 (3): 485-98.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, Cua DJ y Littman DR. *The orphan nuclear receptor ROR γ mat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $^{+}$ T helper cells*. *Cell*, **2006**; 126 (6): 1121-33.

- Ivanova M, Belcheva S, Belcheva I, Negrev N y Tashev R. *Lateralized hippocampal effects of vasoactive intestinal peptide on learning and memory in rats in a model of depression*. Psychopharmacology (Berl.), **2012**; 221 (4): 561-74.
- Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S y Nakae S. *Functional specialization of interleukin-17 family members*. Immunity, **2011**; 34 (2): 149-62.
- Iwakura Y. *Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models*. Cytokine Growth Factor Rev., **2002**; 13 (4-5): 341-55.
- Iwanami K, Matsumoto I, Tanaka-Watanabe Y, Inoue A, Mihara M, Ohsugi Y, Mamura M, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Kishimoto T y Sumida T. *Crucial role of the interleukin-6/interleukin-17 cytokine axis in the induction of arthritis by glucose-6-phosphate isomerase*. Arthritis Rheum., **2008**; 58 (3): 754-63.
- J-
- Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ y Rathmell JC. *Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways*. J. Immunol., **2008**; 180 (7): 4476-86.
- Jadidi-Niaragh F y Mirshafiey A. *Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis*. Scand. J. Immunol., **2010**; 74 (1): 1-13.
- Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, Yu P, Ellis JS, Hoeman CM, Franklin CL y Zaghoulani H. *Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production*. J. Exp. Med., **2008**; 205 (1): 207-18.
- Jamen F, Puech R, Bockaert J, Brabet P y Bertrand G. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors mediating insulin secretion in rodent pancreatic islets are coupled to adenylate cyclase but not to PLC*. Endocrinology, **2002**; 143 (4): 1253-9.
- Jandus C, Bioley G, Rivals JP, Dudler J, Speiser D y Romero P. *Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides*. Arthritis Rheum., **2008**; 58 (8): 2307-17.
- Janeway CA y Medzhitov R. *Innate Immune Recognition*. Annu. Rev. Immunol., **2002**; 20: 197-216.
- Jang E, Cho SH, Park H, Paik DJ, Kim JM y Youn J. *A positive feedback loop of IL-21 signaling provoked by homeostatic CD4⁺CD25⁺ T cell expansion is essential for the development of arthritis in autoimmune K/BxN mice*. J. Immunol., **2009**; 182 (8): 4649-56.
- Janson PC y Winqvist O. *Epigenetics – the Key to Understand Immune Responses in Health and Disease*. Am. J. Reprod. Immunol., **2011**; 66 (Suppl. 1): 72-74.
- Janson PCJ, Winerdal ME y Winqvist O. *At the crossroads of T helper lineage commitment – Epigenetics points the way*. Biochim. Biophys. Acta, **2009**; 1790 (9): 906-19.
- Jefferis R y Mageed RA. *The specificity and reactivity of rheumatoid factors with human IgG*. Monogr. Allergy., **1989**; 26: 45-60.
- Jeker LT y Bluestone JA. *Small RNA Regulators of T Cell-Mediated Autoimmunity*. J. Clin. Immunol., **2010**; 30 (3): 347-57.
- Jensen SL, Fahrenkrug J, Holst JJ, Nielsen OV y Schaffalitzky de Muckadell OB. *Secretory effects of VIP on isolated perfused porcine pancreas*. Am. J. Physiol., **1978**; 235 (4): E387-91.
- Jetten AM, Kurebayashi S y Ueda E. *The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes*. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., **2001**; 69: 205-47.
- Jiang X, Jing H y Ganea D. *VIP and PACAP down-regulate CXCL10 (IP-10) and up-regulate CCL22 (MDC) in spleen cells*. J. Neuroimmunol., **2002**; 133 (1-2): 81-94.
- Jiang X, McClellan SA, Barrett RP, Zhang Y y Hazlett LD. *Vasoactive intestinal peptide downregulates proinflammatory TLRs while upregulating anti-inflammatory TLRs in the infected cornea*. J. Immunol., **2012**; 189 (1): 269-78.
- Jin H, Carrio R, Yu A y Malek TR. *Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis*. J. Immunol., **2004**; 173 (1): 657-65.
- Johnson MC, McCormack RJ, Delgado M, Martínez C y Ganea D. *Murine T-lymphocytes express vasoactive intestinal peptide receptor 1 (VIP-R1) mRNA*. J. Neuroimmunol., **1996**; 68 (1-2): 109-19.
- Johnston CA y Siderovski DP. *Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights*. Mol. Pharmacol., **2007**; 72 (2): 219-30.
- Johnston JA, Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Oppenheim JJ y Kevlin DJ. *Human T lymphocyte chemotaxis and adhesion induced by vasoactive intestinal peptide*. J. Immunol., **1994**; 153 (4): 1762-8.
- Jones CE y Chan K. *Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **2002**; 26 (6): 748-53.
- Jones CP, Gregory LG, Causton B, Campbell GA y Lloyd CM. *Activin A and TGF- β promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology*. J. Allergy Clin. Immunol., **2012**; 129 (4): 1000-10.
- Jones EA, Conover J y Symes AJ. *Identification of a novel gp130-responsive site in the vasoactive intestinal peptide cytokine response element*. J. Biol. Chem., **2000**; 275 (46): 36013-20.
- Jönsson F y Daëron M. *Mast cells and company*. Front. Immunol., **2012**; Feb 20;3:16.
- Jørgensen KT, Harpsøe MC, Jacobsen S, Jess T y Frisch M. *Increased risk of rheumatoid arthritis in women with pregnancy complications and poor self-rated health: a study within the Danish National Birth Cohort*. Rheumatology (Oxford), **2014**; 53 (8): 1513-9.
- Joseph J, Bittner S, Kaiser FM, Wiendl H y Kissler S. *IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes*. J. Immunol., **2012**; 188 (1): 216-21.
- Journot L, Waebler C, Pantaloni C, Holsboer F, Seeburg PH, Bockaert J y Spengler D. *Differential signal transduction by six splice variants of the pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) receptor*. Biochem. Soc. Trans., **1995**; 23 (1): 133-7.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F y Pelletier JP. *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages*. J. Immunol., **1998**; 160 (7): 3513-21.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F y Pelletier JP. *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages*. J. Immunol., **1998**; 160 (7): 3513-21.
- Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M y Pelletier JP. *Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum., **2000**; 43 (5): 1134-44.
- Ju JH, Heo YJ, Cho ML, Jhun JY, Park JS, Lee SY, Oh HJ, Moon SJ, Kwok SK, Park KS, Park SH y Kim HY. *Modulation of STAT-3 in rheumatoid synovial T cells suppresses Th17 differentiation and increases the proportion of Treg cells*. Arthritis Rheum., **2012**; 64 (11): 3543-52.
- Juarranz MG, Bodega G, Prieto JC y Guijarro LG. *Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates rat prostatic epithelial cell proliferation*. Prostate, **2001a**; 47 (4): 285-92.
- Juarranz MG, Bolaños O, Gutiérrez-Cañas I, Lerner EA, Robberecht P, Carmena MJ, Prieto JC y Rodríguez-Henche N. *Neuroendocrine differentiation of the LNCaP prostate cancer cell line maintains the expression and function of VIP and PACAP receptors*. Cell. Signal., **2001b**; 13 (12): 887-94.
- Juarranz MG, De Neef P y Robberecht P. *Vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(1) subtype is predominant in rat prostate membranes*. Prostate, **1999a**; 41 (1): 1-6.
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutiérrez-Cañas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Pablos JL y Gomariz RP. *Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells*. Rheumatology (Oxford), **2004**; 43 (4): 416-22.
- Juarranz MG, Van Rampelbergh J, Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Robberecht P y Waelbroeck M. *Different vasoactive intestinal polypeptide receptor domains are involved in the selective recognition of two VPAC(2)-selective ligands*. Mol. Pharmacol., **1999c**; 56 (6): 1280-7.
- Juarranz MG, Van Rampelbergh J, Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Robberecht P y Waelbroeck M. *Vasoactive intestinal polypeptide VPAC1 and VPAC2 receptor chimeras identify domains responsible for the specificity of ligand binding and activation*. Eur. J. Biochem., **1999b**; 265 (1): 449-56.

- Juarranz Y, Abad C, Martínez C, Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Rosignoli F, Gomariz RP y Leceta J. *Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res. Ther.*, **2005**; 7 (5): R1034-45.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Arranz A, Martínez C, Abad C, Leceta J, Pablos JL y Gomariz RP. *VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF-alpha treatment in human synovial fibroblasts*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2006**; 1070: 359-64.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL y Gomariz RP. *Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts*. *Arthritis Rheum.*, **2008**; 58 (4): 1086-95.
- Jun HS, Santamaria P, Lim HW, Zhang ML y Yoon JW. *Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-cells in T-cell receptor transgenic NOD mice*. *Diabetes*, **1999b**; 48 (1): 34-42.
- Jun HS1, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N y Yoon JW. *The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. *J. Exp. Med.*, **1999a**; 189 (2): 347-58.
- Jüngel A, Distler JH, Kurowska-Stolarska M, Seemayer CA, Seibl R, Forster A, Michel BA, Gay RE, Emmrich F, Gay S y Distler O. *Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2004**; 50 (5): 1468-76.
- Justa S, Zhou X y Sarkar S. *Endogenous IL-22 plays a dual role in arthritis: regulation of established arthritis via IFN- γ responses*. *PLoS One*, **2014**; 9 (3): e93279.
- K-**
- Kaba RA, Camm AJ, Williams TM y Sharma R. *Managing atrial fibrillation in the global community: The European perspective*. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, **2013**; 2013 (2): 173-84.
- Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y y Blauvelt A. *Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis*. *J. Invest. Dermatol.*, **2010**; 130 (5): 1373-83.
- Kägi D, Odermatt B, Ohashi PS, Zinkernagel RM y Hengartner H. *Development of insulinitis without diabetes in transgenic mice lacking perforin-dependent cytotoxicity*. *J. Exp. Med.*, **1996**; 183 (5): 2143-52.
- Kägi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW y Hengartner H. *Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice*. *J. Exp. Med.*, **1997**; 186 (7): 989-97.
- Källberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Padyukov L, Garred P, Frisch M, Karlson EW, Klareskog L y Alfredsson L. *Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies*. *Ann. Rheum. Dis.*, **2009**; 68 (2): 222-7.
- Kanagawa O, Martin SM, Vaupel BA, Carrasco-Marin E y Unanue ER. *Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**; 95 (4): 1721-4.
- Kanhare A, Hertweck A, Bhatia U, Gökmen MR, Perucha E, Jackson I, Lord GM y Jenner RG. *T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements*. *Nat. Commun.*, **2012**; 3: 1268.
- Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW y Wu R. *IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways*. *J. Immunol.*, **2004**; 173 (5): 3482-91.
- Karabiyyik A, Peck AB y Nguyen CQ. *The important role of T cells and receptor expression in Sjögren's syndrome*. *Scand. J. Immunol.*, **2013**; 78 (2): 157-66.
- Kastirr I, Maglie S, Paroni M, Alfen JS, Nizzoli G, Sugliano E, Crosti MC, Moro M, Steckel B, Steinfeld S, Stölzel K, Romagnani C, Botti F, Caprioli F, Pagani M, Abrignani S y Geginat J. *IL-21 Is a Central Memory T Cell-Associated Cytokine That Inhibits the Generation of Pathogenic Th1/17 Effector Cells*. *J. Immunol.*, **2014**; 193 (7): 3322-31.
- Kato H, Endres J y Fox DA. *The roles of IFN- γ versus IL-17 in pathogenic effects of human Th17 cells on synovial fibroblasts*. *Mod. Rheumatol.*, **2013**; 23 (6): 1140-50.
- Kato I, Suzuki Y, Akabane A, Yonekura H, Tanaka O, Kondo H, Takasawa S, Yoshimoto T y Okamoto H. *Transgenic mice overexpressing human vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in pancreatic beta cells*. *Evidence for improved glucose tolerance and enhanced insulin secretion by VIP and PHM-27 in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **1994**; 269 (33): 21223-8.
- Katz Y, Nadiv O y Beer Y. *Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes*. *Arthritis Rheum.*, **2001**; 44 (9): 2176-84.
- Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F y Huang SK. *IL-17 cytokine family*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2004**; 114 (6): 1265-73.
- Kehlen A, Thiele K, Riemann D y Langner J. *Expression, modulation and signalling of IL-17 receptor in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis*. *Clin. Exp. Immunol.*, **2002**; 127 (3): 539-46.
- Keino H, Kezuka T, Takeuchi M, Yamakawa N, Hattori T y Usui M. *Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by vasoactive intestinal peptide*. *Arch. Ophthalmol.*, **2004**; 122 (8): 1179-84.
- Kelchtermans H, Billiau A y Matthys P. *How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check*. *Trends Immunol.*, **2008**; 29 (10): 479-86.
- Kelchtermans H, Geboes L, Mitera T, Huskens D, Leclercq G y Matthys P. *Activated CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis*. *Ann. Rheum. Dis.*, **2009b**; 68 (5): 744-50.
- Kelchtermans H, Schurgers E, Geboes L, Mitera T, Van Damme J, Van Snick J, Uytendhoeve C y Matthys P. *Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon-gamma and counteraction by interferon-gamma*. *Arthritis Res. Ther.*, **2009a**; 11 (4): R122.
- Kellner H. *Targeting interleukin-17 in patients with active rheumatoid arthritis: rationale and clinical potential*. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.*, **2013**; 5 (3): 141-52.
- Kennedy A, Fearon U, Veale DJ y Godson C. *Macrophages in synovial inflammation*. *Front. Immunol.*, **2011**; 2: 52.
- Kermode JC, DeLuca AW, Zilberman A, Valliere J y Shreeve SM. *Evidence for the formation of a functional complex between vasoactive intestinal peptide, its receptor, and Gs in lung membranes*. *J. Biol. Chem.*, **1992**; 267 (5): 3382-8.
- Kerr GS, Sabahi I, Richards JS, Caplan L, Cannon GW, Reimold A, Thiele GM, Johnson D y Mikuls TR. *Prevalence of vitamin D insufficiency/deficiency in rheumatoid arthritis and associations with disease severity and activity*. *J. Rheumatol.*, **2011**; 38 (1): 53-9.
- Kerzerho J, Maazi H, Speak AO, Szely N, Lombardi V, Khoo B, Geryak S, Lam J, Soroosh P, Van Snick J y Akbari O. *Programmed cell death ligand 2 regulates TH9 differentiation and induction of chronic airway hyperreactivity*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2013**; 131 (4): 1048-57.
- Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, Shen F, Eaton SM, Gaffen SL, Swain SL, Locksley RM, Haynes L, Randall TD y Cooper AM. *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge*. *Nat. Immunol.*, **2007**; 8 (4): 369-77.
- Khader SA, Gaffen SL y Kolls JK. *Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa*. *Mucosal Immunol.*, **2009**; 2 (5): 403-11.
- Kiener HP, Niederreiter B, Lee DM, Jimenez-Boj E, Smolen JS y Brenner MB. *Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes*. *Arthritis Rheum.*, **2009**; 60 (5): 1305-10.
- Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, Park SH, Lee SH y Kim HY. *Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-, NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways*. *Rheumatology (Oxford)*, **2007a**; 46 (1): 57-64.
- Kim J, Kang S, Kim J, Kwon G y Koo S. *Elevated levels of T helper 17 cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis*. *Ann. Lab. Med.*, **2013b**; 33 (1): 52-9.
- Kim JS y Jordan MS. *Diversity of IL-17-producing T lymphocytes*. *Cell Mol. Life Sci.*, **2013**; 70 (13): 2271-90.
- Kim JS, Sklarz T, Banks LB, Gohil M, Waickman AT, Skuli N, Krock BL, Luo CT, Hu W, Pollizzi KN, Li MO, Rathmell JC, Birnbaum MJ, Powell JD, Jordan MS y Koretzky GA. *Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways*. *Nat. Immunol.*, **2013a**; 14 (6): 611-8.

- Kim JS, Smith-Garvin JE, Koretzky GA y Jordan MS. *The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells*. J. Exp. Med., **2011**; 208 (11): 2201-7.
- Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, Kim JS, Park SH, Lee SH y Kim HY. *Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction*. Arthritis Rheum., **2007b**; 56 (4): 1076-86.
- Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, Park MK, Cho ML y Lee SH. *Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum., **2012**; 64 (4): 1015-23.
- Kim SJ, Chen Z, Chamberlain ND, Volin MV, Swedler W, Volkov S, Sweiss N y Shahrara S. *Angiogenesis in rheumatoid arthritis is fostered directly by toll-like receptor 5 ligation and indirectly through interleukin-17 induction*. Arthritis Rheum., **2013c**; 65 (8): 2024-36.
- Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I y Jonakait GM. *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- α production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway*. J. Neurosci., **2000**; 20 (10): 3622-30.
- Kimata H y Fujimoto M. *Induction of IgA1 and IgA2 production in immature human fetal B cells and pre-B cells by vasoactive intestinal peptide*. Blood, **1995**; 85 (8): 2098-104.
- Kimata H y Fujimoto M. *Vasoactive intestinal peptide specifically induces human IgA1 and IgA2 production*. Eur. J. Immunol., **1994**; 24 (9): 2262-5.
- Kimata H, Yoshida A, Fujimoto M y Mikawa H. *Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients*. J. Immunol., **1993**; 150 (10): 4630-40.
- Kimata H. *Vasoactive intestinal peptide differentially modulates human immunoglobulin production*. Adv. Neuroimmunol., **1996**; 6 (1): 107-15.
- Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y y Kishimoto T. *Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2008**; 105 (28): 9721-6.
- King C, Ilic A, Koelsch K y Sarvetnick N. *Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity*. Cell, **2004**; 117 (2): 265-77.
- Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, Shnier R y Portek IJ. *Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort)*. Arthritis Rheum., **2006**; 54 (4): 1122-31.
- Kirkpatrick CH. *Chronic mucocutaneous candidiasis*. Pediatr. Infect. Dis. J., **2001**; 20 (2): 197-206.
- Kisand K, Bøe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, Ersvaer E, Perheentupa J, Erichsen MM, Bratanic N, Meloni A, Cetani F, Perniola R, Ergun-Longmire B, Maclaren N, Krohn KJ, Pura M, Schalke B, Ströbel P, Leite ML, Battelino T, Husebye ES, Peterson P, Willcox N y Meager A. *Chronic mucocutaneous candidiasis in APED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines*. J. Exp. Med., **2010**; 207 (2): 299-308.
- Kita H. *Eosinophils: multifunctional and distinctive properties*. Int. Arch. Allergy Immunol., **2013**; 161 (Suppl.2): 3-9.
- Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, Battistini L, Röttschke O y Falk K. *CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4(+) T-cell subset*. Blood, **2005**; 105 (7): 2877-86.
- Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, Stenzel W, Kohler G, Blumenschein WM, Straubinger RK, McClanahan T, Kastelein RA y Alber G. *IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12*. J. Immunol., **2006**; 176 (2): 1098-106.
- Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA y Cua DJ. *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. J. Exp. Med., **2007**; 204 (1): 161-70.
- Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, Langrish CL, Chen Y, Gorman DM, Blumenschein WM, McClanahan T, Brombacher F, Hurst SD, Kastelein RA y Cua DJ. *IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. J. Exp. Med., **2007**; 204 (1): 161-70.
- Knaak JB, Dary CC, Zhang X, Gerlach RW, Tornero-Velez R, Chang DT, Goldsmith R y Blacato JN. *Parameters for pyrethroid insecticide QSAR and PBPK/PD models for human risk assessment*. Rev. Environ. Contam. Toxicol., **2012**; 219: 1-114.
- Knevel R, Krabben A, Wilson AG, Brouwer E, Leijma MK, Lindqvist E, de Rooy DP, Daha NA, van der Linden MP, Tsonaka S, Zernakova A, Westra HJ, Franke L, Houwing-Duistermaat JJ, Toes RE, Huizinga TW, Saxne T y van der Helm-van Mil AH. *A genetic variant in granzyme B is associated with progression of joint destruction in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum., **2013**; 65 (3): 582-9.
- Knip M y Simell O. *Environmental triggers of type 1 diabetes*. Cold Spring Harb. Perspect Med., **2012**; 2 (7): a007690.
- Knudsen SM, Tams JW, Wulff BS y Fahrenkrug J. *A disulfide bond between conserved cysteines in the extracellular loops of the human VIP receptor is required for binding and activation*. FEBS Lett., **1997**; 412 (1): 141-3.
- Ko HJ, Brady JL, Ryg-Cornejo V, Hansen DS, Vremec D, Shortman K, Zhan Y y Lew AM. *GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis*. J. Immunol., **2014**; 192 (5): 2202-9.
- Ko KS, Lee M, Koh JJ y Kim SW. *Combined administration of plasmids encoding IL-4 and IL-10 prevents the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. Mol. Ther., **2001**; 4 (4): 313-6.
- Koara S, Wu Y, Olshansky G y Ridgway WM. *Increased nonobese diabetic Th1:Th2 (IFN- γ :IL-4) ratio is CD4(+) T cell intrinsic and independent of APC genetic background*. J. Immunol., **2002**; 169 (11): 6580-7.
- Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB y Campbell DJ. *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. Nature Immunol., **2009**; 10 (6): 595-602.
- Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K, Terao C, Takahashi A, Yamazaki K, Hosono N, Myouzen K, Tsunoda T, Kamatani N, Furuichi T, Ikegawa S, Ohmura K, Mimori T, Matsuda F, Iwamoto T, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Kubo M, Nakamura Y y Yamamoto K. *A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility*. Nat. Genet., **2010**; 42 (6): 515-9.
- Koenders MI, Devesa I, Marijnissen RJ, Abdollahi-Roodsaz S, Boots AM, Walgreen B, di Padova FE, Nicklin MJ, Joosten LA y van den Berg WB. *Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice*. Arthritis Rheum., **2008**; 58 (11): 3461-70.
- Koenders MI, Joosten LA y van den Berg WB. *Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis*. Ann. Rheum. Dis., **2006**; 65 Suppl 3: iii29-33.
- Koenders MI, Kolls JK, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Joosten LA, Schurr JR, Schwarzenberger P, van den Berg WB y Lubberts E. *Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis*. Arthritis Rheum., **2005b**; 52 (10): 3239-47.
- Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Kolls JK, Joosten LA y van den Berg WB. *Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1*. Arthritis Rheum., **2005a**; 52 (3): 975-83.
- Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Di Padova FE, Boots AM, Gram H, Joosten LA y van den Berg WB. *Blocking of interleukin-17 during reactivation of experimental arthritis prevents joint inflammation and bone erosion by decreasing RANKL and interleukin-1*. Am. J. Pathol., **2005c**; 167 (1): 141-9.
- Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, Lubberts E, Joosten LA, Roth J, van Lent PL, van de Loo FA y van den Berg WB. *Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 β , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis*. Arthritis Rheum., **2011**; 63 (8): 2329-39.
- Koenders MI, Marijnissen RJ, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Di Padova FE, van de Loo FA, Dulos J, van den Berg WB y Boots AM. *T cell lessons from the rheumatoid arthritis synovium SCID mouse model: CD3-rich synovium lacks response to CTLA-4lg but is successfully treated by interleukin-17 neutralization*. Arthritis Rheum., **2012**; 64 (6): 1762-70.

- Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM y Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*, **2008**; 112 (6): 2340-52.
- Kohno M, Tsutsumi A, Matsui H, Sugihara M, Suzuki T, Mamura M, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Suguro T y Sumida T. Interleukin-17 gene expression in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.*, **2008**; 18 (1): 15-22.
- Kojima M, Ito T, Oono T, Hisano T, Igarashi H, Arita Y, Kawabe K, Coy DH, Jensen RT y Nawata H. VIP attenuation of the severity of experimental pancreatitis is due to VPAC1 receptor-mediated inhibition of cytokine production. *Pancreas*, **2005**; 30 (1): 62-70.
- Kolls JK y Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, **2004**; 21 (4): 467-76.
- Komatsu N y Takayanagi H. Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints. *Front. Immunol.*, **2012**; 3: 77.
- Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA y Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.*, **2014**; 20 (1): 62-8.
- Kong N, Lan Q, Chen M, Wang J, Shi W, Horwitz DA, Quesniaux V, Ryffel B, Liu Z, Brand D, Zou H y Zheng SG. Antigen-specific transforming growth factor β -induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance. *Arthritis Rheum.*, **2012**; 64 (8): 2548-58.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M y Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, **2007**; 448 (7152): 484-7.
- Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY y Hama K. GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, **1985**; 239 (4): 420-30.
- Koshy PJ, Henderson N, Logan C, Life PF, Cawston TE y Rowan AD. Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann. Rheum. Dis.*, **2002**; 61 (8): 704-13.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ y Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.*, **1999**; 103 (9): 1345-52.
- Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP y Pestka S. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10R β) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J. Biol. Chem.*, **2001a**; 276 (4): 2725-32.
- Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP y Pestka S. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J. Immunol.*, **2001b**; 166 (12): 7096-103.
- Kozanidou VI, Theocharis AD, Georgiadis A, Voulgari PV, Drosos AA y Karamanos NK. Signal transduction by IL-2 and its receptors as target in treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, **2005**; 5 (1): 41-50.
- Krabben A, Wilson AG, de Rooy DP, Zhernakova A, Brouwer E, Lindqvist E, Saxne T, Stoeken G, van Nies JA, Knevel R, Huizinga TW, Toes R, Gregersen PK y van der Helm-van Mil AH. Association of genetic variants in the IL4 and IL4R genes with the severity of joint damage in rheumatoid arthritis: a study in seven cohorts. *Arthritis Rheum.*, **2013**; 65 (12): 3051-7.
- Kramer JM y Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J. Periodontol.*, **2007**; 78 (6): 1083-93.
- Krawczyk CM, Shen H y Pearce EJ. Functional Plasticity in Memory T Helper. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (7): 4080-8.
- Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D, Krishnaswami S, Burgos-Vargas R, Wilkinson B, Zerbin CA y Zwillich SH. The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum.*, **2009**; 60 (7): 1895-905.
- Kretowski A, Mysliwiec J y Kinalska I. *In vitro* interleukin-13 production by peripheral blood in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus and their first degree relatives. *Scand. J. Immunol.*, **2000**; 51 (3): 321-5.
- Kreuwel HT, Morgan DJ, Krahel T, Ko A, Sarvetnick N y Sherman LA. Comparing the relative role of perforin/granzyme versus Fas/Fas ligand cytotoxic pathways in CD8+ T cell-mediated insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Immunol.*, **1999**; 163 (8): 4335-41.
- Kristiansen OP, Larsen ZM y Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity?. *Genes Immun.*, **2000**; 1 (3): 170-84.
- Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET y Zou W. Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (3): 1423-6.
- Kuchroo VK y Awasthi A. Emerging new roles of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.*, **2012**; 42 (9): 2211-4.
- Kudo M, Ishigatsubo Y y Aoki I. Pathology of asthma. *Front. Microbiol.*, **2013**; 4: 263.
- Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, Aujla SJ, Reardon B, Moore M, Shea P, Schreckhise R, Bukowski TR, Presnell S, Guerra-Lewis P, Parrish-Novak J, Ellsworth JL, Jaspers S, Lewis KE, Appleby M, Kolls JK, Rixon M, West JW, Gao Z y Levin SD. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (8): 5462-73.
- Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC y Schleimer RP. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, **2008**; 123 (3): 398-410.
- Kumar H, Kawai T y Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.*, **2001**; 30 (1): 16-34.
- Kumar P, Natarajan K y Shanmugam N. High glucose driven expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in lymphocytes: molecular mechanisms of IL-17 family gene expression. *Cell. Signal.*, **2014**; 26 (3): 528-39.
- Kurasawa K, Sakamoto A, Maeda T, Sumida T, Ito I, Tomioka H, Yoshida S y Koike T. Short-term administration of anti-L3T4 MoAb prevents diabetes in NOD mice. *Clin. Exp. Immunol.*, **1993**; 91 (3): 376-80.
- Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A y Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells*, **2013**; 18 (4): 247-65.
- Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, Horie I, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Iwakura Y, Sasaki H, Nagayama Y, Kawakami A y Abiru N. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*, **2013**; 56 (8): 1773-80.
- Kurosawa M e Ishizuka T. Inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide on superoxide anion formation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated inflammatory cells in vitro. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1993**; 100 (1): 28-34.
- Kurschus FC, Croxford AL, Heinen AP, Wörtge S, Ielo D y Waisman A. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur. J. Immunol.*, **2010**; 40 (12): 3336-46.
- Kwok SK, Cho ML, Park MK, Oh HJ, Park JS, Her YM, Lee SY, Youn J, Ju JH, Park KS, Kim SI, Kim HY y Park SH. Interleukin-21 promotes osteoclastogenesis in humans with rheumatoid arthritis and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2012**; 64 (3): 740-51.
- Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Kim HP, Oh J, Tunyaplin C, Carotta S, Donovan CE, Goldman ML, Tailor P, Ozato K, Levy DE, Nutt SL, Calame K y Leonard WJ. Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity*, **2009**; 31 (6): 941-52.

-L-

Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötval J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE y Lindén A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J. Immunol.*, **1999**; 162 (4): 2347-52.

Laburthe M, Couvineau A y Tan V. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1631-9.

- Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret J J, Rouyer-Fessard C y Nicole P. *Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **1996**; 805: 94-109.
- Laburthe M, Mangeat P, Marchis-Mouren G y Rosselin G. *Activation of cyclic AMP-dependent protein kinases by vasoactive intestinal peptide (VIP) in isolated intestinal epithelial cells from rat*. Life Sci., **1979a**; 25 (22): 1931-7.
- Laburthe M, Prieto JC, Amiranoff B, Dupont C, Hui Bon Hoa D y Rosselin G. *Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat. 2. Characterization and structural requirements of the stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide on production of adenosine 3':5'-monophosphate*. Eur. J. Biochem., **1979b**; 96 (2): 239-48.
- Laburthe M, Rousset M, Boissard C, Chevalier G, Zweibaum A y Rosselin G. *Vasoactive intestinal peptide: a potent stimulator of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1978**; 75 (6): 2772-5.
- Laburthe M. y Couvineau A. *Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP*. Regul. Pept., **2002**; 108 (2-3): 165-73.
- Lai AY y Kondo M. *T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell*. Semin. Immunol., **2008**; 20 (4): 207-12.
- Lai Kwan Lam Q, King Hung Ko O, Zheng BJ y Lu L. *Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2008**; 105 (39): 14993-8.
- Lajavardi L, Bochot A, Camelo S, Goldenberg B, Naud MC, Behar-Cohen F, Fattal E y de Kozak Y. *Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection of vasoactive intestinal Peptide encapsulated in liposomes*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **2007**; 48 (7): 3230-8.
- Lamacchia C, Palmer G, Seemayer CA, Talabot-Ayer D y Gabay C. *Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist*. Arthritis Rheum., **2010**; 62 (2): 452-62.
- Lambeir AM, Durinx C, Proost P, Van Damme J, Scharpé S y De Meester I. *Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion*. FEBS Lett., **2001**; 507 (3): 327-30.
- Lamperti ED, Rosen KM y Villa-Komaroff L. *Characterization of the gene and messages for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat and mouse*. Brain Res. Mol. Brain Res., **1991**; 9 (3): 217-31.
- Langer I, Gregoire F, Nachtergaele I, De Neef P, Vertongen P y Robberecht P. *Hexanoylation of a VPAC2 receptor-preferring ligand markedly increased its selectivity and potency*. Peptides, **2004b**; 25 (2): 275-8.
- Langer I, Vertongen P, Perret J, Waelbroeck M y Robberecht P. *A small sequence in the third intracellular loop of the VPAC(1) receptor is responsible for its efficient coupling to the calcium effector*. Biochem. Soc. Trans., **2002**; 30 (4): 447-50.
- Langer I. *Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies*. Front. Endocrinol. (Lausanne), **2012**; 3: 129.
- Langer JA, Cutrone EC y Kotenko S. *The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions*. Cytokine Growth Factor Rev., **2004a**; 15 (1): 33-48.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA y Cua DJ. *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J. Exp. Med., **2005**; 201 (2): 233-40.
- Lara-Marquez M, O'Dorisio M, O'Dorisio T, Shah M y Karacay B. *Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells*. J. Immunol., **2001**; 166 (4): 2522-30.
- Larocca L, Calafat M, Roca V, Franchi AM y Leirós CP. *VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages*. Int. Immunopharmacol., **2007**; 7 (10): 1343-9.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM y O'Shea JJ. *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. Immunity, **2007**; 26 (3): 371-81.
- Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS, Boylston AW, Emery P, Ponchel F y Isaacs JD. *Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood*. Rheumatology (Oxford), **2006**; 45 (10): 1210-7.
- Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, Oukka M, Kuchroo VK y Glimcher LH. *T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t*. Nat. Immunol., **2011**; 12 (1): 96-104.
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Ganea D y Delgado M. *Receptors and transcriptional factors involved in the anti-inflammatory activity of VIP and PACAP*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **2000**; 921: 92-102.
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Carrión M, Arranz A y Juarranz Y. *Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation*. Neuroimmunomodulation, **2007**; 14 (3-4): 134-8.
- Leceta J, Martínez C, Delgado M, Garrido E y Gomariz RP. *Expression of vasoactive intestinal peptide in lymphocytes: a possible endogenous role in the regulation of the immune system*. Adv. Neuroimmunol., **1996**; 6 (1): 29-36.
- Leceta J, Martinez MC, Delgado M, Garrido E y Gomariz RP. *Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in the rat*. Peptides, **1994**; 15 (5): 791-7.
- Lee DM y Weinblatt ME. *Rheumatoid arthritis*. Lancet, **2001**; 358 (9285): 903-11.
- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M y Brenner MB. *Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis*. Science, **2007**; 315 (5814): 1006-10.
- Lee M, Kim AY y Kang Y. *Defects in the differentiation and function of bone marrow-derived dendritic cells in non-obese diabetic mice*. J. Korean Med. Sci., **2000**; 15 (2): 217-23.
- Lee SY, Kwok SK, Son HJ, Ryu JG, Kim EK, Oh HJ, Cho ML, Ju JH, Park SH y Kim HY. *IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation*. Arthritis Res. Ther., **2013**; 15 (1): R31.
- Lee WW, Kang SW, Choi J, Lee SH, Shah K, Eynon EE, Flavell RA y Kang I. *Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor*. Blood, **2010**; 115 (3): 530-40.
- Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A y Kuchroo VK. *Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells*. Nat. Immunol., **2012**; 13 (10): 991-9.
- Lee Y, Chin RK, Christiansen P, Sun Y, Tumanov AV, Wang J, Chervonsky AV y Fu YX. *Recruitment and activation of naive T cells in the islets by lymphotoxin beta receptor-dependent tertiary lymphoid structure*. Immunity, **2006**; 25 (3): 499-509.
- Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO y Weaver CT. *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. Immunity, **2009**; 30 (1): 92-107.
- Lees JR y Farber DL. *Generation, persistence and plasticity of CD4 T-cell memories*. Immunology, **2010**; 130 (4): 463-70.
- Lehuen A, Diana J, Zaccane P y Cooke A. *Immune cell crosstalk in type 1 diabetes*. Nat. Rev. Immunol., **2010**; 10 (7): 501-13.
- Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H y Skapenko A. *Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis*. Arthritis Rheum., **2010**; 62 (10): 2876-85.
- Leipe J, Schramm MA, Grunke M, Baeuerle M, Dechant C, Nigg AP, Witt MN, Vielhauer V, Reindl CS, Schulze-Koops H y Skapenko A. *Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis*. Ann. Rheum. Dis., **2011**; 70 (8): 1453-7.
- Leonard WJ, Zeng R y Spolski R. *Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age*. J. Leukoc. Biol., **2008**; 84 (2): 348-56.
- Lepault F y Gagnerault MC. *Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice*. J. Immunol., **2000**; 164 (1): 240-7.
- Lethaby A, Lopez-Olivo MA, Maxwell L, Burls A, Tugwell P y Wells GA. *Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis*. Cochrane Database Syst. Rev., **2013**; 5: CD004525.

- Leung JM y Loke P. A role for IL-22 in the relationship between intestinal helminths, gut microbiota and mucosal immunity. *Int. J. Parasitol.*, **2013**; 43 (3-4): 253-7.
- Leveque L, Deknuydt F, Bioley G, Old LJ, Matsuzaki J, Odunsi K, Ayyoub M y Valmori D. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4⁺ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J. Immunother.*, **2009**; 32 (2): 101-8.
- Levine JS. Mechanism of Soluble Cytokine Receptor Generation. *J. Immunol.*, **2004**; 173 (9): 5343-8.
- Lexberg MH, Taubner A, Albrecht I, Lepenies I, Richter A, Kamradt T, Radbruch A y Chang HD. IFN- γ and IL-12 synergize to convert *in vivo* generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur. J. Immunol.*, **2010**; 40 (11): 3017-27.
- Lexberg MH, Taubner A, Förster A, Albrecht I, Richter A, Kamradt T, Radbruch A y Chang HD. Th memory for interleukin-17 expression is stable *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*, **2008**; 38 (10): 2654-64.
- Li CR, Mueller EE y Bradley LM. Islet antigen-specific Th17 cells can induce TNF- α -dependent autoimmune diabetes. *J. Immunol.*, **2014**; 192 (4): 1425-32.
- Li H, Mei Y, Wang Y y Xu L. Vasoactive intestinal polypeptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J. Clin. Immunol.*, **2006b**; 26 (5): 430-7.
- Li J, Shen W, Kong K y Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.*, **2006a**; 64 (5): 515-22.
- Li J, Tomkinson KN, Tan XY, Wu P, Yan G, Spaulding V, Deng B, Annis-Freeman B, Heveron K, Zollner R, De Zutter G, Wright JF, Crawford TK, Liu W, Jacobs KA, Wolfman NM, Ling V, Pittman DD, Veldman GM y Fouser LA. Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2. *Int. Immunopharmacol.*, **2004**; 4 (5): 693-708.
- Li J, Yin Q y Wu H. Structural Basis of Signal Transduction in the TNF Receptor Superfamily. *Adv. Immunol.*, **2013a**; 119: 135-53.
- Li JM, Darlak KA, Southerland L, Hossain MS, Jaye DL, Josephson CD, Rosenthal H y Waller EK. VIPhyb, an antagonist of vasoactive intestinal peptide receptor, enhances cellular antiviral immunity in murine cytomegalovirus infected mice. *PLoS One*, **2013b**; 8 (5): e63381.
- Li L, Kim J y Boussiotis VA. IL-1 β -mediated signals preferentially drive conversion of regulatory T cells but not conventional T cells into IL-17-producing cells. *J. Immunol.*, **2010**; 185 (7): 4148-53.
- Li L, Patsoukis N, Petkova V y Boussiotis VA. Runx1 and Runx3 are involved in the generation and function of highly suppressive IL-17-producing T regulatory cells. *PLoS One*, **2012a**; 7 (9): e45115.
- Li N, Wang JC, Liang TH, Zhu MH, Wang JY, Fu XL, Zhou JR, Zheng SG, Chan P y Han J. Pathologic finding of increased expression of interleukin-17 in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2013c**; 6 (7): 1375-9.
- Li X, Murray F, Koide N, Goldstone J, Dann SM, Chen J, Bertin S, Fu G, Weinstein LS, Chen M, Corr M, Eckmann L, Insel PA y Raz E. Divergent requirement for Gas and cAMP in the differentiation and inflammatory profile of distinct mouse Th subsets. *J. Clin. Invest.*, **2012c**; 122 (3): 963-73.
- Li Y, Jiang L, Zhang S, Yin L, Ma L, He D Y Shen J. Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. *Rheumatol. Int.*, **2012b**; 32 (8): 2415-22.
- Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, Goldman SJ, Dunussi-Joannopoulos K, Williams CM, Wright JF y Fouser LA. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (11): 7791-9.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M y Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.*, **2006**; 203 (10): 2271-9.
- Liao JJ, Huang MC y Goetzl EJ. Cutting edge: Alternative signaling of Th17 cell development by sphingosine 1-phosphate. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (9): 5425-8.
- Liao W, Lin JX, Wang L, Li P y Leonard WJ. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (6): 551-9.
- Licona-Limón P, Henao-Mejía J, Temann AU, Gagliani N, Licona-Limón I, Ishigame H, Hao L, Herbert DR y Flavell RA. Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity*, **2013**; 39 (4): 744-57.
- Liew FY, Li Y y Millott S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.*, **1990**; 145 (12): 4306-10.
- Liew FY, Wei XQ y McInnes IB. Role of interleukin 18 in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **2003**; 62 Suppl 2: ii48-50.
- Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, Guglani L, Alcorn JF, Strawbridge H, Park SM, Onishi R, Nyugen N, Walter MJ, Pociask D, Randall TD, Gaffen SL, Iwakura Y, Kolls JK y Khader SA. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity*, **2009**; 31 (5): 799-810.
- Linder S, Barkhem T, Norberg A, Persson H, Schalling M, Hökfelt T y Magnusson G. Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**; 84 (2): 605-9.
- Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M y Tree TI. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, **2005**; 54 (1): 92-9.
- Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM, Crabtree GR, Peng K, Wilson SR y Goodnow CC. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity*, **2004**; 21 (6): 817-30.
- Litherland SA, Grebe KM, Belkin NS, Paek E, Elf J, Atkinson M, Morel L, Clare-Salzler MJ y McDuffie M. Nonobese diabetic mouse congenic analysis reveals chromosome 11 locus contributing to diabetes susceptibility, macrophage STAT5 dysfunction, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor overproduction. *J. Immunol.*, **2005**; 175 (7): 4561-5.
- Litwin DK, Wilson AK y Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) inhibits rat alveolar macrophage phagocytosis and chemotaxis *in vitro*. *Regul. Pept.*, **1992**; 40 (1): 63-74.
- Liu D, Krajniak K, Chun D, Sena M, Casillas R, Lelièvre V, Nguyen T, Bravo D, Colburn S, y Waschek JA. VIP gene transcription is regulated by far upstream enhancer and repressor elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**; 284 (1): 211-8.
- Liu H y Rohowsky-Kochan C. Interleukin-27-mediated suppression of human Th17 cells is associated with activation of STAT1 and suppressor of cytokine signaling protein 1. *J. Interferon Cytokine Res.*, **2011**; 31 (5): 459-69.
- Liu JZ, Pezeshki M y Raffatellu M. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine*, **2009**; 48 (1-2): 156-60.
- Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH y Tsai CN. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.*, **2005**; 62 (3): 312-7.
- Liu S, Song X, Chrzynek BA, Shanker S, Hoth LR, Marr ES y Griffor MC. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat. Commun.*, **2013**; 4: 1888.
- Liu SM, Lee DH, Sullivan JM, Chung D, Jäger A, Shum BO, Sarvetnick NE, Anderson AC y Kuchroo VK. Differential IL-21 signaling in APCs leads to disparate Th17 differentiation in diabetes-susceptible NOD and diabetes-resistant NOD.Ldd3 mice. *J. Clin. Invest.*, **2011**; 121 (11): 4303-10.
- Lodde BM, Delparte C, Goldsmith CM, Tak PP y Baum BJ. A recombinant adenoviral vector encoding functional vasoactive intestinal peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**; 319 (1): 189-92.
- Lodde BM, Mineshiba F, Wang J, Cotrim AP, Afione S, Tak PP y Baum BJ. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, **2006**; 65 (2): 195-200.
- Lossius A, Johansen JN, Torkildsen Ø, Vartdal F y Holmøy T. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis – association and causation. *Viruses*, **2012**; 4 (12): 3701-30.

- Love JA, Go VL y Szurszewski JH. Vasoactive intestinal peptide and other peptides as neuromodulators of colonic motility in the guinea pig. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1988**; 527: 360-8.
- Lowman MA, Benyon RC y Church MK. Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. *Br. J. Pharmacol.*, **1988**; 95 (1): 121-30.
- Lowther DE, Chong DL, Ascough S, Ettorre A, Ingram RJ, Boyton RJ y Altmann DM. Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta Neuropathol.*, **2013**; 126 (4): 501-15.
- Lu J, Zheng MH, Yan J, Chen YP y Pan JP. Effects of vasoactive intestinal peptide on phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.*, **2008b**; 8 (10): 1449-54.
- Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D y Rudensky AY. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, **2010**; 142 (6): 914-29.
- Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, Anderson PW, Lipsitch M y Malley R. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog.*, **2008a**; 4 (9): e1000159.
- Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA y van den Berg WB. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*, **2001**; 167 (2): 1004-13.
- Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, Schwarzenberger P, Kolls J y van den Berg WB. Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm. Res.*, **2002**; 51 (2): 102-4.
- Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, van den Gersselaar LA y van den Berg WB. Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum.*, **2000**; 43 (6): 1300-6.
- Lubberts E, Koenders MI y van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.*, **2005a**; 7 (1): 29-37.
- Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA y van den Berg WB. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.*, **2004**; 50 (2): 650-9.
- Lubberts E, Schwarzenberger P, Huang W, Schurr JR, Peschon JJ, van den Berg WB y Kolls JK. Requirement of IL-17 receptor signaling in radiation-resistant cells in the joint for full progression of destructive synovitis. *J. Immunol.*, **2005b**; 175 (5): 3360-8.
- Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA y van den Berg WB. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J. Immunol.*, **2003**; 170 (5): 2655-62.
- Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis?. *Cytokine*, **2008**; 41 (2): 84-91.
- Lubberts E. The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2003**; 4 (5): 572-7.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD y Xia B. CD4⁺ T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.*, **2012**; 2012:925135.
- Lundberg JM, Anggård A, Pernow J y Hökfelt T. Neuropeptide Y-, substance P- and VIP-immunoreactive nerves in cat spleen in relation to autonomic vascular and volume control. *Cell. Tissue Res.*, **1985**; 239 (1): 9-18.
- Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T y Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **2010**; 6 (12): 727-30.
- Luo Q, Wang Y, Feng D, Xu Y y Xu L. Vasoactive intestinal peptide attenuates concanavalin A-mediated liver injury. *Eur. J. Pharmacol.*, **2009**; 607 (1-3): 226-33.
- Luo X, Zeng W, Xu X, Popov S, Davignon I, Wilkie TM, Mumby SM y Muallem S. Alternate coupling of receptors to Gs and Gi in pancreatic and submandibular gland cells. *J. Biol. Chem.*, **1999**; 274 (25): 17684-90.
- Luopajarvi K, Skarsvik S, Ilonen J, Akerblom HK y Vaarala O. Reduced CCR4, interleukin-13 and GATA-3 up-regulation in response to type 2 cytokines of cord blood T lymphocytes in infants at genetic risk of type 1 diabetes. *Immunology*, **2007**; 121 (2): 189-96.
- Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, **1998**; 338 (7): 436-45.
- Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D y Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity*, **2000**; 12 (5): 471-81.
- Lutz EM, MacKenzie CJ, Johnson M, West K, Morrow JA, Harmar AJ y Mitchell R. Domains determining agonist selectivity in chimaeric VIP2 (VPAC2)/PACAP (PAC1) receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **1999b**; 128 (4): 934-40.
- Lutz EM, Shen S, Mackay M, West K y Harmar AJ. Structure of the human VIPR2 gene for vasoactive intestinal peptide receptor type 2. *FEBS lett.*, **1999a**; 458 (2): 197-203.
- Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G y Harmar AJ. The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS lett.*, **1993**; 334 (1): 3-8.
- Lygren I, Revhaug A, Burhol PG, Giercksky KE y Jenssen TG. Vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin in leucocytes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1984**; 44 (4): 347-51.

-M-

- Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, Fulcher DA, Tangye SG y Cook MC. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.*, **2008**; 205 (7): 1551-7.
- Ma Y, Ma M, Dai Y y Hong A. Expression, identification and biological effects of a novel VPAC2-specific agonist with high stability and bioactivity. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **2010**; 42 (1): 21-9.
- Maciver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Colloff JL y Rathmell JC. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J. Leukoc. Biol.*, **2008**; 84 (4): 949-57.
- Mackay CR e Imhof BA. Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today*, **1993**; 14 (3): 99-102.
- Mackay M, Fantes J, Scherer S, Boyle S, West K, Tsui LC, Belloni E, Lutz E, Van Heyningen V y Harmar AJ. Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. *Genomics*, **1996**; 37 (3): 345-53.
- MacKenzie CJ, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, Holland PJ y Mitchell R. Mechanisms of phospholipase C activation by the vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type 2 receptor. *Endocrinology*, **2001**; 142 (3): 1209-17.
- Madsen B, Georg B, Madsen MW y Fahrenkrug J. Estradiol down regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor type-1 in breast cancer cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2001**; 172 (1-2): 203-11.
- Maeshima K, Yamaoka K, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Saito K, Ohishi M, Miyahara H, Tanaka S, Ishii K, Yoshimatsu H y Tanaka Y. The JAK inhibitor tofacitinib regulates synovitis through inhibition of interferon-γ and interleukin-17 production by human CD4⁺ T cells. *Arthritis Rheum.*, **2012**; 64 (6): 1790-8.
- Maggi L, Cimaz R, Capone M, Santarlasci V, Querci V, Simonini G, Nencini F, Liotta F, Romagnani S, Maggi E, Annunziato F y Cosmi L. Brief report: etanercept inhibits the tumor necrosis factor α-driven shift of Th17 lymphocytes toward a nonclassical Th1 phenotype in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, **2014**; 66 (5): 1372-7.
- Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, Querci V, Fambrini M, Liotta F, Levings MK, Maggi E, Cosmi L, Romagnani S y Annunziato F. CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.*, **2010**; 40 (8): 2174-81.
- Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, Cimaz R, De Palma R, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Cosmi L y Annunziato F. Distinctive features of classical and nonclassical (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.*, **2012**; 42 (12): 3180-8.

- Magistretti PJ y Morrison JH. *Noradrenaline- and vasoactive intestinal peptide-containing neuronal systems in neocortex: functional convergence with contrasting morphology*. *Neuroscience*, **1988**; 24 (2): 367-78.
- Magistretti PJ, Hof PR, Martin JL, Dietl M y Palacios JM. *High- and low-affinity binding sites for vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat kidney revealed by light microscopic autoradiography*. *Regul. Pept.*, **1988**; 23 (2): 145-52.
- Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K y Tochino Y. *Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice*. *Jikken Dobutsu*, **1980**; 29 (1): 1-13.
- Male D, Brostoff J, Rott DB y Roitt I. *Immunología*. 7ª edición. Madrid: Ediciones Elsevier, **2007**. ISBN: 978-84-8086-233-2.
- Malek TR y Castro I. *Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity*. *Immunity*, **2010**; 33 (2): 153-65.
- Malemud CJ. *Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis*. *Clin. Chim. Acta*, **2007**; 375 (1-2): 10-9.
- Malfait AM, Butler DM, Presky DH, Maini RN, Brennan FM y Feldmann M. *Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis*. *Clin. Exp. Immunol.*, **1998**; 111 (2): 377-83.
- Malhotra N, Robertson E y Kang J. *SMAD2 is essential for TGF beta-mediated Th17 cell generation*. *J. Biol. Chem.*, **2010**; 285 (38): 29044-8.
- Malhotra RK, Wakade TD y Wakade AR. *Vasoactive intestinal polypeptide and muscarine mobilize intracellular Ca²⁺ through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion. Role of IP3 in exocytosis*. *J. Biol. Chem.*, **1988**; 263 (5): 2123-6.
- Mallone R y Brezar V. *To B or not to B: (anti)bodies of evidence on the crime scene of type 1 diabetes?*. *Diabetes*, **2011**; 60 (8): 2020-2.
- Mandke R y Singh J. *Cationic nanomicelles for delivery of plasmids encoding interleukin-4 and interleukin-10 for prevention of autoimmune diabetes in mice*. *Pharm. Res.*, **2012**; 29 (3): 883-97.
- Manel N, Unutmaz D y Littman DR. *The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma*. *Nat. Immunol.*, **2008**; 9 (6): 641-9.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR y Weaver CT. *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. *Nature*, **2006**; 441 (7090): 231-4.
- Manoury-Schwartz B, Chiocchia G, Bessis N, Abelsira-Amar O, Batteux F, Muller S, Huang S, Boissier MC y Fournier C. *High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors*. *J. Immunol.*, **1997**; 158 (11): 5501-6.
- Manzo A, Paoletti S, Carulli M, Blades MC, Barone F, Yanni G, Fitzgerald O, Bresnahan B, Caporali R, Montecucco C, Uguccioni M y Pitzalis C. *Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis*. *Eur. J. Immunol.*, **2005**; 35 (5): 1347-59.
- Marie JC, Rouyer-Fessard C, Couvineau A, Nicole P, Devaud H, El Benna J y Laburthe M. *Serine 447 in the carboxyl tail of human VPAC1 receptor is crucial for agonist-induced desensitization but not internalization of the receptor*. *Mol. Pharmacol.*, **2003**; 64 (6): 1565-74.
- Marijnissen RJ, Koenders MI, Smeets RL, Stappers MH, Nickerson-Nutter C, Joosten LA, Boots AM y van den Berg WB. *Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation*. *Arthritis Rheum.*, **2011**; 63 (10): 2939-48.
- Marijnissen RJ, Roeleveld DM, Young D, Nickerson-Nutter C, Abdollahi-Roodsaz S, Garcia de Aquino S, van de Loo FA, van Spruiel AB, Boots AM, van den Berg WB y Koenders MI. *Interleukin-21 receptor deficiency increases the initial toll-like receptor 2 response but protects against joint pathology by reducing Th1 and Th17 cells during streptococcal cell wall arthritis*. *Arthritis Rheumatol.*, **2014**; 66 (4): 886-95.
- Mariño E y Grey ST. *A new role for an old player: do B cells unleash the self-reactive CD8+ T cell storm necessary for the development of type 1 diabetes?*. *J. Autoimmun.*, **2008**; 31 (3): 301-5.
- Marks BR, Nowyhed HN, Choi JY, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA y Craft J. *Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation*. *Nat. Immunol.*, **2009**; 10 (10): 1125-32.
- Marleau AM, Summers KL y Singh B. *Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice*. *J. Immunol.*, **2008**; 180 (8): 5235-49.
- Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA y Pelletier JP. *Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK)*. *Arthritis Rheum.*, **1999**; 42 (11): 2399-409.
- Martin B, Shin YK, White CM, Ji S, Kim W, Carlson OD, Napora JK, Chadwick W, Chapter M, Waschek JA, Mattson MP, Maudsley S y Egan JM. *Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression*. *Diabetes*, **2010**; 59 (5): 1143-52.
- Martin DA, Churchill M, Flores-Suarez L, Cardiel MH, Wallace D, Martin R, Phillips K, Kaine JL, Dong H, Salinger D, Stevens E, Russell CB y Chung JB. *A phase Ib multiple ascending dose study evaluating safety, pharmacokinetics, and early clinical response of brodalumab, a human anti-IL-17R antibody, in methotrexate-resistant rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res. Ther.*, **2013**; 15 (5): R164.
- Martinez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D y Leceta J. *Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes*. *J. Neuroimmunol.*, **1999**; 93 (1-2): 126-38.
- Martinez C, Delgado M, Gomariz RP y Ganea D. *Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 inhibit IL-10 production in murine T lymphocytes*. *J. Immunol.*, **1996**; 156 (11): 4128-36.
- Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D y Gomariz RP. *VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies*. *J. Neuroimmunol.*, **1998**; 85 (2): 155-67.
- Martinez C, Ortiz AM, Juarranz Y, Lamana A, Seoane IV, Leceta J, García-Vicuña R, Gomariz RP y González-Álvaro I. *Serum levels of vasoactive intestinal peptide as a prognostic marker in early arthritis*. *PLoS One*, **2014**; 9 (1): e85248.
- Martinez GJ, Zhang Z, Chung Y, Reynolds JM, Lin X, Jetten AM, Feng XH y Dong C. *Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation*. *J. Biol. Chem.*, **2009**; 284 (51): 35283-6.
- Martinez GJ, Zhang Z, Reynolds JM, Tanaka S, Chung Y, Liu T, Robertson E, Lin X, Feng XH y Dong C. *Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells*. *J. Biol. Chem.*, **2010**; 285 (38): 29039-43.
- Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH y Dong C. *Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells*. *Eur. J. Immunol.*, **2009**; 39 (1): 216-24.
- Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, Xu L, Priatel JJ, Levings MK y Tan R. *Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes*. *J. Immunol.*, **2010**; 185 (7): 3814-8.
- Marwaha AK, Tan S y Dutz JP. *Targeting the IL-17/IFN-gamma axis as a potential new clinical therapy for type 1 diabetes*. *Clin. Immunol.*, **2014**; 154 (1): 84-9.
- Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Castel H, Leprince J, Fournier A, Dejda A, Vaudry H y Tonon MC. *Role of PACAP and VIP in astroglial functions*. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1753-60.
- Massot B, Michel ML, Diem S, Ohnmacht C, Latour S, Dy M, Eberl G y Leite-de-Moraes MC. *TLR-induced cytokines promote effective proinflammatory natural Th17 cell responses*. *J. Immunol.*, **2014**; 192 (12): 5635-42.
- Masteller EL, Warner MR, Tang Q, Tarbell KV, McDevitt H y Bluestone JA. *Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice*. *J. Immunol.*, **2005**; 175 (5): 3053-9.
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Kapur R, Belladonna ML, Kansas GS y Kaplan MH. *T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype*. *Blood*, **2006**; 108 (5): 1595-601.
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS y Kaplan MH. *Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells*. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (8): 4901-7.

- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL y Cyster JG. *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. *Nature*, **2004**; 427 (6972): 355-60.
- Matsui T, Akahoshi T, Namai R, Hashimoto A, Kurihara Y, Rana M, Nishimura A, Endo H, Kitasato H, Kawai S, Takagishi K y Kondo H. *Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis*. *Clin. Exp. Immunol.*, **2001**; 125 (1): 155-61.
- McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, MacKenzie CJ y Mitchell R. *Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**; 921: 175-85.
- McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, MacKenzie CJ, Holland PJ y Mitchell R. *ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC(1) receptor splice variant*. *Mol. Pharmacol.*, **2001**; 59 (6): 1523-32.
- McGeachy MJ y McSorley SJ. *Microbial-induced Th17: superhero or supervillain?* *J. Immunol.*, **2012**; 189 (7): 3285-91.
- McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T y Cua DJ. *TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology*. *Nat. Immunol.*, **2007**; 8 (12): 1390-7.
- McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, McClanahan TK, O'Shea JJ y Cua DJ. *The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo*. *Nat. Immunol.*, **2009**; 10 (3): 314-24.
- McGeachy MJ. *GM-CSF: the secret weapon in the T(H)17 arsenal*. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (6): 521-2.
- McGuire HM, Vogelzang A, Hill N, Flodström-Tullberg M, Sprent J y King C. *Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106 (46): 19438-43.
- McGuire HM, Walters S, Vogelzang A, Lee CM, Webster KE, Sprent J, Christ D, Grey S y King C. *Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models*. *Diabetes*, **2011**; 60 (3): 867-75.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M y Byrne MC. *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. *Immunity*, **2002**; 16 (2): 311-323.
- McInnes IB y Leung BP. *Innate response cytokines in inflammatory synovitis: a role for interleukin-15*. *Curr. Dir. Autoimmun.*, **2001**; 3: 200-15.
- McInnes IB, Liew FY y Gracie JA. *Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid arthritis?* *Arthritis Res. Ther.*, **2005**; 7 (1): 38-41.
- McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Warrier RR, Connaughton SE, Hall LB, Arp LH, Gately MK y Magram J. *Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice*. *Eur. J. Immunol.*, **1996**; 26 (12): 2933-8.
- Mehers KL y Gillespie KM. *The genetic basis for type 1 diabetes*. *Br. Med. Bull.*, **2008**; 88 (1): 115-29.
- Mellanby RJ, Thomas D, Phillips JM y Cooke A. *Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells*. *Immunology*, **2007**; 121 (1): 15-28.
- Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamisi M, Wei X y Lukic ML. *IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin*. *Eur. J. Immunol.*, **2006**; 36 (1): 216-23.
- Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG e Iowa Women's Health Study. *Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study*. *Arthritis Rheum.*, **2004**; 50 (1): 72-7.
- Metalnikov S y Chorine V. *Rôle des réflexes conditionnels dans immunité*. *Annales de l'Institut Pasteur*, **1928a**; 40: 893-900.
- Metalnikov S y Chorine V. *Rôles des réflexes conditionnels dans la formation des anticorps*. *C. R. Soc. Biol.*, **1928b**; 99: 142-4.
- Metawi SA, Abbas D, Kamal MM e Ibrahim MK. *Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA*. *Clin. Rheumatol.*, **2011**; 30 (9): 1201-7.
- Metwali A, Blum AM, Li J, Elliott DE y Weinstock JV. *IL-4 regulates VIP receptor subtype 2 mRNA (VPAC2) expression in T cells in murine schistosomiasis*. *FASEB J.*, **2000**; 14 (7): 948-54.
- Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan SA, Nichols AG y Rathmell JC. *Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets*. *J. Immunol.*, **2011**; 186 (6): 3299-303.
- Mihara M, Ohsugi Y y Kishimoto T. *Evidence for the role of Th17 cell inhibition in the prevention of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody*. *Biofactors.*, **2009**; 35 (1): 47-51.
- Miljkovic D, Cvetkovic I, Momcilovic M, Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grubic S y Trajkovic V. *Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase-dependent toxicity in mouse beta cells*. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2005**; 62 (22): 2658-68.
- Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE y Douek DC. *Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome*. *Nature*, **2008**; 452 (7188): 773-6.
- Miltenburg AM, van Laar JM, de Kuiper R, Daha MR y Breedveld FC. *T cells cloned from human rheumatoid synovial membrane functionally represent the Th1 subset*. *Scand. J. Immunol.*, **1992**; 35 (5): 603-10.
- Min B, Brown MA y LeGros G. *Understanding the roles of basophils: breaking dawn*. *Immunology*, **2012**; 135 (3): 192-7.
- Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I y Karasuyama H. *Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome*. *J. Exp. Med.*, **2009**; 206 (6): 1291-301.
- Miossec P y Kolls JK. *Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation*. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2012**; 11 (10): 763-76.
- Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, Cantor H, Bettelli E y Kuchroo VK. *Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**; 107 (32): 14292-7.
- Miura S, Serizawa H, Tsuzuki Y, Kurose I, Suematsu M, Higuchi H, Shigematsu T, Hokari R, Hirokawa M, Kimura H e Ishii H. *Vasoactive intestinal peptide modulates T lymphocyte migration in Peyer's patches of rat small intestine*. *Am. J. Physiol.*, **1997**; 272 (1 Pt 1): G92-9.
- Mody R, Tramontano A y Paul S. *Spontaneous hydrolysis of vasoactive intestinal peptide in neutral aqueous solution*. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1994**; 44 (5): 441-7.
- Moisan J, Grenningloh R, Bettelli E, Oukka M y Ho IC. *Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation*. *J. Exp. Med.*, **2007**; 204 (12): 2825-35.
- Molinero P, Calvo JR, Goberna R y Guerrero JM. *The interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with isolated bovine thyroid plasma membranes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1985**; 128 (3): 1336-41.
- Moller K y Sundler F. *Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla*. *Regul. Pept.*, **1996**; 63 (2-3): 129-39.
- Monte K, Wilson C y Shih FF. *Increased number and function of FoxP3 regulatory T cells during experimental arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2008**; 58 (12): 3730-41.
- Moody TW, Hill JM y Jensen RT. *VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells*. *Peptides*, **2003**; 24 (1): 163-77.
- Moore TC y Lachmann PJ. *Cyclic AMP reduces and cyclic GMP increases the traffic of lymphocytes through peripheral lymph nodes of sheep in vivo*. *Immunology*, **1982**; 47 (3): 423-8.
- Moore TC. *Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances*. *Immunology*, **1984**; 52 (3): 511-8.
- Moran EM, Connolly M, Gao W, McCormick J, Fearon U y Veale DJ. *Interleukin-17A induction of angiogenesis, cell migration, and cytoskeletal rearrangement*. *Arthritis Rheum.*, **2011**; 63 (11): 3263-73.
- Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, Bresnihan B, Veale DJ y Fearon U. *Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies*. *Arthritis Res. Ther.*, **2009**; 11 (4): R113.

- Morel G, Besson J, Rosselin G y Dubois PM. Ultrastructural evidence for endogenous vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, **1982**; 34 (2): 85-9.
- Moreno D, Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M y Robberecht P. Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor. *Peptides*, **2000**; 21 (10): 1543-9.
- Moreno O, González CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martín J y Ramírez G. Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, **2007**; 34 (1): 36-42.
- Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, de Vries RR y Toes RE. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum.*, **2005**; 52 (7): 2212-21.
- Morgan ME, Suttmüller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR y Toes RE. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **2003**; 48 (5): 1452-60.
- Mori Y, Suko M, Okudaira H, Matsuba I, Tsuruoka A, Sasaki A, Yokoyama H, Tanase T, Shida T, Nishimura M, et al. Preventive effects of cyclosporin on diabetes in NOD mice. *Diabetologia*, **1986**; 29 (4): 244-7.
- Morisset J, Douziech N, Rydzewska G, Buscail L y Rivard N. Cell signalling pathway involved in PACAP-induced AR4-2J cell proliferation. *Cell. Signal.*, **1995**; 7 (3): 195-205.
- Moro O y Lerner EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J. Biol. Chem.*, **1997**; 272 (2): 966-70.
- Moroo I, Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Saito J, Saito Y y Hirai A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res.*, **1998**; 795 (1-2): 191-6.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L y Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2003**; 14 (2): 155-74.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA y Coffman RL. Two types of murine T helper cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, **1986**; 136 (7): 2348-57.
- Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R y Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, **2005**; 140 (2): 360-7.
- Moutoussamy S, Kelly PA y Finidori J. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur. J. Biochem.*, **1998**; 255 (1): 1-11.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M y Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, **2007**; 317 (5835): 256-60.
- Mukasa R, Balasubramani A, Lee YK, Whitley SK, Weaver BT, Shibata Y, Crawford GE, Hatton RD y Weaver CT. Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. *Immunity*, **2010**; 32 (5): 616-27.
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY y Reiner SL. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*, **2001**; 292 (5523): 1907-10.
- Muñoz LM, Holgado BL, Martínez-A C, Rodríguez-Frade JM y Mellado M. Chemokine receptor oligomerization: a further step toward chemokine function. *Immunol. Lett.*, **2012**; 145 (1-2): 23-9.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD y Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, **2003**; 198 (12): 1951-7.
- Murphy K, Travers P y Walport M. *Immunobiología de Janeway*. 7ª edición. México D.F.: Ediciones McGraw Hill, **2009**. ISBN-13: 978-970-10-7347-6.
- Murphy KM y Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat. Immunol.*, **2010**; 11 (8): 674-80.
- Murray HW, Rubin BY y Carreiro SM. Human mononuclear phagocyte antiprotazoal mechanism: Oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **1985**; 134 (3): 1982-8.
- Murray PJ y Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, **2012**; 11 (11): 723-37.
- Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA y Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.*, **1997**; 61 (19): 1861-78.
- Myers LK, Tang B, Stuart JM y Kang AH. The role of IL-4 in regulation of murine collagen-induced arthritis. *Clin. Immunol.*, **2002**; 102 (2): 185-91.
- Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Myśliwska J, Lipska BS, Wiśniewski P y Myśliwski A. Serum and urinary cytokine homeostasis and renal tubular function in children with type 1 diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, **2006**; 19 (12): 1421-7.

-N-

Nachtergaeel I, Vertongen P, Langer I, Perret J, Robberecht P y Waelbroeck M. Evidence for a direct interaction between the Thr11 residue of vasoactive intestinal polypeptide and Tyr184 located in the first extracellular loop of the VPAC2 receptor. *Biochem. J.*, **2003**; 370 (Pt 3): 1003-9.

Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, Kemmotsu K, Imai T, Yoshie O, Abe H, Tada K, Nakamura M, Sugamura K y Takano S. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J. Immunol.*, **1999**; 162 (3): 1278-86.

Nagem RA, Colau D, Dumoutier L, Renauld JC, Ogata C y Polikarpov I. Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Structure*, **2002**; 10 (8): 1051-62.

Nakae S, Komiya Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M e Iwakura Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, **2002**; 17 (3): 375-87.

Nakae S, Nambu A, Sudo K e Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.*, **2003b**; 171 (11): 6173-7.

Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S e Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003a**; 100 (10): 5986-90.

Nakayama S, Takahashi H, Kanno Y y O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.*, **2012**; 24 (3): 297-302.

Nakken B, Munthe LA, Konttinen YT, Sandberg AK, Szekanecz Z, Alex P y Szodoray P. B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis—current concepts and future perspectives. *Autoimmun. Rev.*, **2011**; 11 (1): 28-34.

Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszek J, Field SF, Stevens HE, Reynolds P, Hardy M, King E, Masters J, Hulme J, Maier LM, Smyth D, Bailey R, Cooper JD, Ribas G, Campbell RD, Clayton DG, Todd JA y Wellcome Trust Case Control Consortium. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature*, **2007**; 450 (7171): 887-92.

Nelson JL, Hughes KA, Smith AG, Nisporos BB, Branchaud AM y Hansen JA. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.*, **1993**; 329 (7): 466-71.

Nepom GT, Ehlers M y Mandrup-Poulsen T. Anti-cytokine therapies in T1D: Concepts and strategies. *Clin. Immunol.*, **2013**; 149 (3): 279-85.

Neufert C, Becker C, Wirtz S, Fantini MC, Weigmann B, Galle PR y Neurath MF. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur. J. Immunol.*, **2007**; 37 (7): 1809-16.

Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapere JJ, Jamin N y Laburthe M. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key?. *Trends Biochem. Sci.*, **2008**; 33 (7): 314-9.

Ng WF, von Delwig A, Carmichael AJ, Arkwright PD, Abinun M, Cant AJ, Jolles S y Lilic D. Impaired T(H)17 responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with and without autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2010**; 126 (5): 1006-15.

Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D y Benoist C. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2007**; 56 (2): 509-20.

- Nicole P, Du K, Couvineau A y Laburthe M. Site-directed mutagenesis of human vasoactive intestinal peptide receptor subtypes VIP1 and VIP2: evidence for difference in the structure-function relationship. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**; 284 (2): 744-50.
- Nicole P, Lins L, Rouyer-Fessard C, Drouot C, Fulcrand P, Thomas A, Couvineau A, Martinez J, Brasseur R y Laburthe M. Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *J. Biol. Chem.*, **2000**; 275 (31): 24003-12.
- Nielsen DS, Krych L, Buschard K, Hansen CH y Hansen AK. Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett.*, **2014**; pii: S0014-5793(14)00296-8.
- Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J y Konttinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2002**; 966: 384-99.
- Nilsson SF, De Neef P, Robberecht P y Christophe J. Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase. *Exp. Eye Res.*, **1994**; 58 (4): 459-67.
- Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M y Wedderburn LR. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**; 107 (33): 14751-6.
- Nitta Y, Kawamoto S, Tashiro F, Aihara H, Yoshimoto T, Nariuchi H, Tabayashi K y Miyazaki J. IL-12 plays a pathologic role at the inflammatory loci in the development of diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.*, **2001**; 16 (2): 97-104.
- Niu X, He D, Zhang X, Yue T, Li N, Zhang JZ, Dong C y Chen G. IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.*, **2010**; 71 (4): 334-41.
- Noble JA y Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.*, **2011**; 11 (6): 533-42.
- Nogales KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Cardinale I, Khatcherian A, Gonzalez J, Pierson KC, White IR, Pensabene C, Coats I, Novitskaya I, Lowes MA y Krueger JG. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br. J. Dermatol.*, **2008**; 159 (5): 1092-102.
- Nomura M, Ueta Y, Serino R, Kabashima N, Shibuya I y Yamashita H. PACAP type I receptor gene expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Neuroreport*, **1996**; 8 (1): 67-70.
- Noorchashm H, Noorchashm N, Kern J, Rostami SY, Barker CF y Naji A. B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, **1997**; 46 (6): 941-6.
- Nordlind K y Mutt V. Influence of beta-endorphin, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal peptide on the proliferative response of human peripheral blood T lymphocytes to mercuric chloride. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **1986a**; 80 (3): 326-8.
- Nordlind K y Mutt V. Modulating effect of beta-endorphin, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal peptide on the proliferative response of peripheral blood T lymphocytes of nickel-allergic patients to nickel sulfate. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **1986b**; 81 (4): 368-70.
- Nti BK, Markman JL, Bertera S, Styche AJ, Lakomy RJ, Subbotin VM, Trucco M y Zorina TD. Treg cells in pancreatic lymph nodes: the possible role in diabetogenesis and β cell regeneration in a T1D model. *Cell. Mol. Immunol.*, **2012**; 9 (6): 455-63.
- Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM y Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, **2007**; 448 (7152): 480-3.
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Stephanie S, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q y Dong C. Generation of follicular helper T cells is mediated by IL-21 but independent of T helper 1, 2 or 17 cell lineages. *Immunity*, **2008**; 29 (1): 138-49.
- Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH y Dong C. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*, **2009**; 325 (5943): 1001-5.
- Nussdorfer GG y Malendowicz LK. Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides*, **1998**; 19 (8): 1443-67.
- Nyirenda MH, Sanvito L, Darlington PJ, O'Brien K, Zhang GX, Constantinescu CS, Bar-Or A y Gran B. TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J. Immunol.*, **2011**; 187 (5): 2278-90.
- Obermajer N, Popp FC, Soeder Y, Haarer J, Geissler EK, Schlitt HJ y Dahlke MH. Conversion of Th17 into IL-17Aneg Regulatory T Cells: A Novel Mechanism in Prolonged Allograft Survival Promoted by Mesenchymal Stem Cell-Supported Minimized Immunosuppressive Therapy. *J. Immunol.*, **2014**; 193 (10): 4988-99.
- O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, Bush JA, Li G, Finegood DT y Dutz JP. A deficiency in the *in vivo* clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J. Autoimmun.*, **2006**; 26 (2): 104-15.
- O'Brien BA, Huang Y, Geng X, Dutz JP y Finegood DT. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced. *Diabetes*, **2002**; 51 (8): 2481-8.
- O'Connell RM, Rao AD, Chaudhuri AA y Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, **2010**; 10 (2): 111-2.
- O'Dorisio MS, Hermina NS, O'Dorisio TM y Balcerzak SP. Vasoactive intestinal polypeptide modulation of lymphocyte adenylate cyclase. *J. Immunol.*, **1981**; 127 (6): 2551-4.
- O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Cataland S y Balcerzak SP. Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **1980**; 96 (4): 666-72.
- O'Dorisio MS, Shannon BT, Fleshman DJ y Campolito LB. Identification of high affinity receptors for vasoactive intestinal peptide on human lymphocytes of B cell lineage. *J. Immunol.*, **1989**; 142 (10): 3533-6.
- Oestreich KJ y Weinmann AS. Master regulators or lineage-specifying? Changing views on CD4⁺ T cell transcription factors. *Nat. Rev. Immunol.*, **2012b**; 12 (11): 799-804.
- Oestreich KJ y Weinmann AS. T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription. *Trends Immunol.*, **2012a**; 33 (2): 78-83.
- Oestreich KJ, Mohn SE y Weinmann AS. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFF-like gene profile. *Nat. Immunol.*, **2012c**; 13 (4): 405-11.
- O'Garra A y Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.*, **2007**; 7 (6): 425-8.
- Ogawa N, List JF, Habener JF y Maki T. Cure of overt diabetes in NOD mice by transient treatment with anti-lymphocyte serum and exendin-4. *Diabetes*, **2004**; 53 (7): 1700-5.
- Ogawa N, Minamimura K, Kodaka T y Maki T. Short administration of polyclonal anti-T cell antibody (ALS) in NOD mice with extensive insulinitis prevents subsequent development of autoimmune diabetes. *J. Autoimmun.*, **2006**; 26 (4): 225-31.
- Ohmori Y, Onoue S, Endo K, Matsumoto A, Uchida S y Yamada S. Development of dry powder inhalation system of novel vasoactive intestinal peptide (VIP) analogue for pulmonary administration. *Life Sci.*, **2006**; 79 (2): 138-43.
- Okamoto K y Takayanagi H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int. Immunopharmacol.*, **2011**; 11 (5): 543-8.
- Olsson C y Holmgren S. The control of gut motility. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **2001**; 128 (3): 481-503.
- Onoue , Ohmori Y, Matsumoto A, Yamada S, Kimura R, Yajima T y Kashimoto K. Structure-activity relationship of synthetic truncated analogues of vasoactive intestinal peptide (VIP): an enhancement in the activity by a substitution with arginine. *Life Sci.*, **2004**; 74 (12): 1465-77.
- Onoue S, Aoki Y, Matsui T, Kojo Y, Misaka S, Mizumoto T y Yamada S. Formulation design and *in vivo* evaluation of dry powder inhalation system of new vasoactive intestinal peptide derivative ((R(15, 20, 21), L(17), A(24,25), des-N(28))-VIP-GRR) in experimental asthma/COPD model rats. *Int. J. Pharm.*, **2011**; 410 (1-2): 54-60.
- Onoue S, Matsui T, Kato M, Mizumoto T, Liu B, Liu L, Karaki S, Kuwahara A y Yamada S. Chemical synthesis and formulation design of a PEGylated vasoactive intestinal peptide derivative with improved metabolic stability. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2013**; 49 (3): 382-9.

- Onoue S, Misaka S y Yamada S. Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **2008**; 377 (4-6): 579-90.
- Onyüksel H, Ashok B, Dagar S, Sethi V y Rubinstein I. Interactions of VIP with rigid phospholipid bilayers: implications for vasoreactivity. *Peptides*, **2003**; 24 (2): 281-6.
- Onyüksel H, Ikezaki H, Patel M, Gao XP y Rubinstein I. A novel formulation of VIP in sterically stabilized micelles amplifies vasodilation in vivo. *Pharm. Res.*, **1999**; 16 (1): 155-60.
- Onyüksel H, Mohanty PS y Rubinstein I. VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: a novel targeted nanomedicine for breast cancer. *Int. J. Pharm.*, **2009**; 365 (1-2): 157-61.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF y Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, **2000**; 13 (5): 715-25.
- Ørom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang Q, Guigo R y Shiekhattar R. Long Noncoding RNAs with Enhancer-like Function in Human Cells. *Cell*, **2010**; 143 (1): 46-58.
- Ortner A, Wernig K, Kaisler R, Edetsberger M, Hajos F, Köhler G, Mosgoeller W y Zimmer A. VPAC receptor mediated tumor cell targeting by protamine based nanoparticles. *J. Drug Target.*, **2010**; 18 (6): 457-67.
- Oschilewski U, Kiesel U y Kolb H. Administration of silica prevents diabetes in BB-rats. *Diabetes*, **1985**; 34 (2): 197-9.
- O'Shea JJ y Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science*, **2010**; 327 (5969): 1098-102.
- O'Shea JJ y Plenge R. JAKs and STATs in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity*, **2012**; 36 (4): 542-50.
- O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, Watford WT, Wei L, Adamson AS y Fan S. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect.*, **2009**; 11 (5): 599-611.
- Osorio F, LeibundGut-Landmann S, Lochner M, Lahl K, Sparwasser T, Eberl G y Reis e Sousa C. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur. J. Immunol.*, **2008**; 38 (12): 3274-81.
- Ottaway CA y Greenberg GR. Interaction of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen responses. *J. Immunol.*, **1984**; 132 (1): 417-23.
- Ottaway CA, Bernaerts C, Chan B y Greenberg GR. Specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating mononuclear cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **1983**; 61 (7): 664-71.
- Ottaway CA, Lay TE y Greenberg GR. High affinity specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating T cells, B cells and large granular lymphocytes. *J. Neuroimmunol.*, **1990**; 29 (1-3): 149-55.
- Ottaway CA, Lewis DL y Asa SL. Vasoactive intestinal peptide-containing nerves in Peyer's patches. *Brain Behav. Immun.*, **1987**; 1 (2): 148-58.
- Ottaway CA. Selective effects of vasoactive intestinal peptide on the mitogenic response of murine T cells. *Immunology*, **1987**; 62 (2): 291-7.
- Ottesen B y Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1995**; 172 (5): 1615-31.
- Otto C, Zuschratter W, Gass P y Schutz G. Presynaptic localization of the PACAP-type1-receptor in hippocampal and cerebellar mossy fibres. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **1999**; 66 (1-2): 163-74.
- Ottosson A y Edvinsson L. Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. *Cephalalgia*, **1997**; 17 (3): 166-74.
- Ouyang W, Kolls JK y Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*, **2008**; 28 (4): 454-67.
- Ouyang W, Löhning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A y Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity*, **2000**; 12 (1): 27-37.
- Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC y Murphy KM. Inhibition of Th1 Development Mediated by GATA-3 through an IL-4-Independent Mechanism. *Immunity*, **1998**; 9 (5): 745-55.
- Ozaki K y Leonard WJ. Cytokine and Cytokine Receptor Pleiotropy and Redundancy. *J. Biol. Chem.*, **2002**; 277 (33): 29355-8.
- Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR y Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**; 97 (21): 11439-44.
- P-
- Pacquelet S, Presle N, Boileau C, Dumond H, Netter P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Terlain B y Jouzeau JY. Interleukin 17, a nitric oxide-producing cytokine with a peroxynitrite-independent inhibitory effect on proteoglycan synthesis. *J. Rheumatol.*, **2002**; 29 (12): 2602-10.
- Pagani M, Rossetti G, Panzeri I, de Candia P, Bonnal RJ, Rossi RL, Geginat J y Abrignani S. Role of microRNAs and long-noncoding RNAs in CD4⁺ T-cell differentiation. *Immunol. Rev.*, **2013**; 253 (1): 82-96.
- Page G y Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum.*, **2005**; 52 (8): 2307-12.
- Pakala SV, Kurrer MO y Katz JD. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.*, **1997**; 186 (2): 299-306.
- Palmer JB, Cuss FM y Barnes PJ. VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways. *J. Appl. Physiol.* (1985), **1986**; 61 (4): 1322-8.
- Pandolfi SJ, Dharmasathaphorn K, Schoeffield MS, Vale W y Rivier J. Vasoactive intestinal peptide receptor antagonist [4Cl-D-Phe6, Leu17] VIP. *Am. J. Physiol.*, **1986**; 250 (4 Pt 1): G553-7.
- Pankhaniya R, Jabrane-Ferrat N, Gaufo GO, Sreedharan, SP, Dazin P, Kaye J y Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide enhancement of antigen-induced differentiation of a cultured line of mouse thymocytes. *FASEB J.*, **1998**; 12 (1): 119-27.
- Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, Bockaert J y Journot L. Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.*, **1996**; 271 (36): 22146-51.
- Panzer M, Sitte S, Wirth S, Drexler I, Sparwasser T y Voehringer D. Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. *J. Immunol.*, **2012**; 188 (2): 615-23.
- Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W y Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. *J. Clin. Immunol.*, **2010**; 30 (2): 185-95.
- Parish CR y Liew FY. Immune response to chemically modified flagelin 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagelin. *J. Exp. Med.*, **1972**; 135 (2): 298-311.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q y Dong C. A distinct lineage of CD4⁺ T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.*, **2005**; 6 (11): 1133-41.
- Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S y Youn J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4⁺CD25⁺ T cells. *Int. Immunol.*, **2004**; 16 (8): 1203-13.
- Park MJ, Park HS, Oh HJ, Lim JY, Yoon BY, Kim HY, Cho ML y Cho SG. IL-17-deficient allogeneic bone marrow transplantation prevents the induction of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Exp. Mol. Med.*, **2012**; 44 (11): 694-705.
- Park YE, Woo YJ, Park SH, Moon YM, Oh HJ, Kim JI, Jin HS, Baek SH, Kim GT, Lee JH, Cho ML y Kim SI. IL-17 increases cadherin-11 expression in a model of autoimmune experimental arthritis and in rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.*, **2011**; 140 (1-2): 97-103.
- Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR,

- Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD y Foster D. *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function*. *Nature*, **2000**; 408 (6808): 57-63.
- Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA y Romagnani S. *Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**; 88 (10): 4538-42.
- Parsonage G, Filer A, Bik M, Hardie D, Lax S, Howlett K, Church LD, Raza K, Wong SH, Trebilcock E, Scheel-Toellner D, Salmon M, Lord JM y Buckley CD. *Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNF α* . *Arthritis Res. Ther.*, **2008**; 10 (2): R47.
- Pasare C y Medzhitov R. *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. *Science*, **2003**; 299 (5609): 1033-6.
- Passemar S, Sokolowska P, Schwendemann L y Gressens P. *VIP-induced neuroprotection of the developing brain*. *Curr. Pharm. Des.*, **2011**; 17 (10): 1036-9.
- Patel AM y Moreland LW. *Interleukin-6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis: a review of tocilizumab therapy*. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2010**; 4: 263-78.
- Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G y EURODIAB Study Group. *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study*. *Lancet*, **2009**; 373 (9680): 2027-33.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Florcak M, Gawronska-Szklarz B y Herczynska M. *The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatol. Int.*, **2005**; 26 (1): 48-51.
- Peck A y Mellins ED. *Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis*. *Clin. Immunol.*, **2009**; 132 (3): 295-304.
- Peck A y Mellins ED. *Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example*. *Immunology*, **2010b**; 129 (2): 147-53.
- Peck A y Mellins ED. *Precarious balance: Th17 cells in host defense*. *Infect. Immun.*, **2010a**; 78 (1): 32-8.
- Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J y Frisch M. *Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides*. *Arthritis Res. Ther.*, **2006**; 8 (4): R133.
- Pei L. *Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene*. *J. Biol. Chem.*, **1996**; 271 (34): 20879-84.
- Pelletier M y Girard D. *Biological functions of interleukin-21 and its role in inflammation*. *Scientific World Journal*, **2007**; 7: 1715-35.
- Peña J. *Inmunología online [en línea]*. **2003**. Suárez A, Mozo L y Gutiérrez-Martín C. "Citocinas y quimiocinas". Capítulo 9. ISBN 84-607-6953-4. <<http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>>.
- Pérez-García S, Juarranz Y, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, Margioris A, Pablos JL, Tsatsanis C y Gomariz RP. *Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide*. *J. Cell. Physiol.*, **2011**; 226 (12): 3261-9.
- Peruzzi M, Azzari C, Rossi ME, De Martino M y Vierucci A. *Inhibition of natural killer cell cytotoxicity and interferon gamma production by the envelope protein of HIV and prevention by vasoactive intestinal peptide*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **2000**; 16 (11): 1067-73.
- Peters A, Lee Y y Kuchroo VK. *The many faces of Th17 cells*. *Curr. Opin. Immunol.*, **2011b**; 23 (6): 702-6.
- Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, Wucherpfennig K, Turley S, Carroll MC, Sobel RA, Bettelli E y Kuchroo VK. *Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation*. *Immunity*, **2011a**; 35 (6): 986-96.
- Peuriere S, Susini C, Esteve JP, Vaysse N y Escoula L. *Dual effect of vasoactive intestinal peptide on the mitogenic response of rabbit spleen lymphocytes*. *Regul. Pept.*, **1990**; 27 (1): 117-26.
- Phillips JM, Parish NM, Raine T, Bland C, Sawyer Y, De La Peña H y Cooke A. *Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations*. *Rev. Diabet. Stud.*, **2009**; 6 (2): 97-103.
- Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM 2nd, Kolls JK, Pope RM y Shahrara S. *IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis*. *J. Immunol.*, **2010**; 184 (6): 3233-41.
- Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS y Lernmark A. *Autoantibodies in diabetes*. *Diabetes*, **2005**; 54 Suppl 2: S52-61.
- Pincus DW, DiCicco-Bloom E y Black IB. *Trophic mechanisms regulate mitotic neuronal precursors: role of vasoactive intestinal peptide (VIP)*. *Brain Res.*, **1994**; 663 (1): 51-60.
- Pincus DW, DiCicco-Bloom EM y Black IB. *Vasoactive intestinal peptide regulation of neuroblast mitosis and survival: role of cAMP*. *Brain Res.*, **1990**; 514 (2): 355-7.
- Pirot P, Cardozo AK y Eizirik DL. *Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes*. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, **2008**; 52 (2): 156-65.
- Pisegna JR y Wank SA. *Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**; 90 (13): 6345-9.
- Pisegna JR, Lyu RM y Germano PM. *Essential structural motif in the C-terminus of the PACAP type I receptor for signal transduction and internalization*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**; 921: 195-201.
- Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Koenders MI, Baeuerle PA y van den Berg WB. *Combined blockade of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 17 pathways potently suppresses chronic destructive arthritis in a tumour necrosis factor alpha-independent mouse model*. *Ann. Rheum. Dis.*, **2009**; 68 (5): 721-8.
- Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, Pe'er I, Burt NP, Blumenstiel B, DeFelice M, Parkin M, Barry R, Winslow W, Healy C, Graham RR, Neale BM, Izmailova E, Roubenoff R, Parker AN, Glass R, Karlson EW, Maher N, Hafler DA, Lee DM, Seldin MF, Remmers EF, Lee AT, Padyukov L, Alfredsson L, Coby J, Weinblatt ME, Gabriel SB, Purcell S, Klareskog L, Gregersen PK, Shadick NA, Daly MJ y Altshuler D. *Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis*. *Nat. Genet.*, **2007**; 39 (12): 1477-82.
- Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L, Altshuler D, Gregersen PK, Klareskog L y Rioux JD. *Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4*. *Am. J. Hum. Genet.*, **2005**; 77 (6): 1044-60.
- Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Todd JA, Rich SS y Nerup J. *Genetics of type 1 diabetes: what's next?*. *Diabetes*, **2010**; 59 (7): 1561-71.
- Poirot L, Benoist C y Mathis D. *Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**; 101 (21): 8102-7.
- Polak JM y Bloom SR. *Localisation and measurement of VIP in the genitourinary system of man and animals*. *Peptides*, **1984**; 5 (2): 225-30.
- Pongratz G y Straub RH. *Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis*. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **2013**; 9 (2): 117-26.
- Pozo D, Anderson P y Gonzalez-Rey E. *Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide*. *J. Immunol.*, **2009**; 183 (7): 4346-59.
- Pozo D, Delgado M, Martínez C, Gomariz RP, Guerrero JM y Calvo JR. *Functional characterization and mRNA expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) type I receptors in rat peritoneal macrophages*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**; 1359 (3): 250-62.
- Pozo D, Delgado M, Martínez M, Guerrero JM, Leceta J, Gomariz RP y Calvo JR. *Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP)*. *Immunol. Today*, **2000**; 21 (1): 7-11.
- Pozo D, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Anderson P, Varela N y Delgado M. *Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders*. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1833-46.
- Prieto JC, Laburthe M, Hoa DH y Rosselin G. *Quantitative studies of vasoactive intestinal peptide (VIP) binding sites and VIP-induced adenosine 3':5'-monophosphate production in epithelial cells from duodenum, jejunum,*

ileum, cecum, colon and rectum in the rat. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **1981**; 96 (1): 100-6.

Prochazka M, Leiter EH, Serreze DV y Coleman DL. *Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice*. *Science*, **1987**; 237 (4812): 286-9.

Prussin C, Yin Y y Upadhyaya B. T(H)2 heterogeneity: Does function follow form?. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2010**; 126 (6): 1094-8.

Pryor-Jones RA y Jenkins JS. *Vasoactive intestinal peptide and anterior pituitary function*. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, **1988**; 29 (6): 677-88.

Puel A, Cypowij S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, Migaud M, Israel L, Chrabieh M, Audry M, Gumbleton M, Toulon A, Bodemer C, El-Baghdati J, Whitters M, Paradis T, Brooks J, Collins M, Wolfman NM, Al-Muhsen S, Galicchio M, Abel L, Picard C y Casanova JL. *Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity*. *Science*, **2011**; 332 (6025): 65-8.

Puel A, Cypowij S, Maródi L, Abel L, Picard C y Casanova JL. *Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis*. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **2012**; 12 (6): 616-22.

Puel A, Picard C, Cypowij S, Lilic D, Abel L y Casanova JL. *Inborn errors of mucocutaneous immunity to Candida albicans in humans: a role for IL-17 cytokines?*. *Curr. Opin. Immunol.*, **2010**; 22 (4): 467-74.

Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, De Giorgio R, Salvarani C, Macchioni P, Frizziero L y Meliconi R. *Synovial expression of vasoactive intestinal peptide in polymyalgia rheumatica*. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **2006**; 24 (5): 562-6.

Purvis HA, Stoop JN, Mann J, Woods S, Kozijn AE, Hambleton S, Robinson JH, Isaacs JD, Anderson AE y Hilken CM. *Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses*. *Blood*, **2010**; 116 (23): 4829-37.

-Q-

Qian BF, Hammarström ML y Danielsson A. *Differential expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor 1 and 2 mRNA in murine intestinal T lymphocyte subtypes*. *J. Neuroendocrinol.*, **2001**; 13 (9): 818-25.

Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, Benveniste EN y Cong Y. *TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3*. *J. Immunol.*, **2009**; 183 (1): 97-105.

Qiu JF, Zhang ZQ, Chen W y Wu ZY. *Protective effects of vasoactive intestinal peptide on septic shock rats*. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, **2007**; 45 (3): 196-9.

Qu F, Liu HJ, Xiang Y, Tan YR, Liu C, Zhu XL y Qin XQ. *Activation of CFTR trafficking and gating by vasoactive intestinal peptide in human bronchial epithelial cells*. *J. Cell. Biochem.*, **2011**; 112 (3): 902-8.

Qu Z, Huang XN, Ahmadi P, Andresevic J, Planck SR, Hart CE y Rosenbaum JT. *Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease*. *Lab. Invest.*, **1995**; 73 (3): 339-46.

Quayle AJ, Chomarat P, Miossec P, Kjeldsen-Kragh J, Førre O y Natvig JB. *Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns*. *Scand. J. Immunol.*, **1993**; 38 (1): 75-82.

Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M y Weiner HL. *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. *Nature*, **2008**; 453 (7191): 65-71.

-R-

Rachdi L, Marie JC y Scharfmann R. *Role for VPAC2 receptor-mediated signals in pancreas development*. *Diabetes*, **2003**; 52 (1): 85-92.

Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsois RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S y Bäuml AJ. *Lipocalin-2 resistance confers an advantage to Salmonella enterica serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine*. *Cell Host Microbe*, **2009**; 5 (5): 476-86.

Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S y Bäuml AJ. *Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut*. *Nat. Med.*, **2008**; 14 (4): 421-8.

Rafferty S, Alcolado N, Norez C, Chappe F, Pelzer S, Becq F y Chappe V. *Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**; 331 (1): 2-13.

Ramanathan S, Dubois S, Chen XL, Leblanc C, Ohashi PS y Ilangumaran S. *Exposure to IL-15 and IL-21 enables autoreactive CD8 T cells to respond to weak antigens and cause disease in a mouse model of autoimmune diabetes*. *J. Immunol.*, **2011**; 186 (9): 5131-41.

Ramirez JM, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes T, Dayer JM, Saurat JH, Roosnek E y Chizzolini C. *Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells*. *Eur. J. Immunol.*, **2010**; 40 (9): 2450-9.

Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, Kolls JK, Khader SA y Randall TD. *The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17*. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (7): 639-46.

Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS y Delovitch TL. *Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice*. *J. Exp. Med.*, **1993b**; 178 (1): 87-99.

Rapoport MJ, Lazarus AH, Jaramillo A, Speck E y Delovitch TL. *Thymic T cell anergy in autoimmune nonobese diabetic mice is mediated by deficient T cell receptor regulation of the pathway of p21ras activation*. *J. Exp. Med.*, **1993a**; 177 (4): 1221-6.

Raposo BR, Rodrigues-Santos P, Carvalheiro H, Agua-Doce AM, Carvalho L, Pereira da Silva JA, Graça L y Souto-Carneiro MM. *Monoclonal anti-CD8 therapy induces disease amelioration in the K/BxN mouse model of spontaneous chronic polyarthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2010**; 62 (10): 2953-62.

Rasche SS, Phillips M, McInerney MF, Sercarz EE y Quinn A. *IL-13Ra1 expression on beta-cell-specific T cells in NOD mice*. *Diabetes*, **2011**; 60 (6): 1716-25.

Rasmussen TK, Andersen T, Hvid M, Hetland ML, Hørslev-Petersen K, Stengaard-Pedersen K, Holm CK y Deleuran B. *Increased interleukin 21 (IL-21) and IL-23 are associated with increased disease activity and with radiographic status in patients with early rheumatoid arthritis*. *J. Rheumatol.*, **2010**; 37 (10): 2014-20.

Ratsimandresy RA, Duvallet E, Assier E, Semerano L, Delavallée L, Bessis N, Zagury JF y Boissier MC. *Active immunization against IL-23p19 improves experimental arthritis*. *Vaccine*, **2011**; 29 (50): 9329-36.

Raverdeau M y Mills KH. *Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid*. *J. Immunol.*, **2014**; 192 (7): 2953-8.

Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD y Salmon M. *Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin*. *Arthritis Res. Ther.*, **2005**; 7 (4): R784-95.

Reed HE, Cutler DJ, Brown TM, Brown J, Coen CW y Piggins HD. *Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro*. *J. Neuroendocrinol.*, **2002**; 14 (8): 639-46.

Rehman KK, Trucco M, Wang Z, Xiao X y Robbins PD. *AAV8-mediated gene transfer of interleukin-4 to endogenous beta-cells prevents the onset of diabetes in NOD mice*. *Mol. Ther.*, **2008**; 16 (8): 1409-16.

Reichlin S. *Neuroendocrine significance of vasoactive intestinal polypeptide*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1988**; 527: 431-49.

Reichstetter S, Castillo GM, Rubinstein I, Nishimoto-Ashfield A, Lai M, Jones CC, Banerjee AA, Lyubimov A, Bloedow DC, Bogdanov A Jr y Bolotin EM. *Protected graft copolymer excipient leads to a higher acute maximum tolerated dose and extends residence time of vasoactive intestinal Peptide significantly better than sterically stabilized micelles*. *Pharm. Res.*, **2013**; 30 (3): 670-82.

Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Groot K y Czompoly T. *Antagonistic actions of analogs related to growth hormone-releasing hormone (GHRH) on receptors for GHRH and vasoactive intestinal peptide on rat pituitary and pineal cells in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**; 97 (3): 1218-23.

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL y Gregersen PK. *STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. *N. Engl. J. Med.*, **2007**; 357 (10): 977-86.

- Remmers EF, Sano H y Wilder RL. Platelet-derived growth factors and heparin-binding (fibroblast) growth factors in the synovial tissue pathology of rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, **1991**; 21 (3): 191-9.
- Reynolds G, Cooles FA, Isaacs JD y Hilkens CM. Emerging immunotherapies for rheumatoid arthritis. *Hum. Vaccin. Immunother.*, **2014**; 10 (4): 822-37.
- Reynolds JM, Angkasekwinai P y Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2010**; 21 (6): 413-23.
- Richer MJ y Horwitz MS. Coxsackievirus infection as an environmental factor in the etiology of type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.*, **2009**; 8 (7): 611-5.
- Ridgway WM, Ito H, Fassò M, Yu C y Fathman CG. Analysis of the role of variation of major histocompatibility complex class II expression on nonobese diabetic (NOD) peripheral T cell response. *J. Exp. Med.*, **1998**; 188 (12): 2267-75.
- Riou F, Cespuglio R y Jouvét M. Hypnogenic properties of the vasoactive intestinal polypeptide in rats. *C. R. Seances Acad. Sci. III*, **1981**; 293 (12): 679-82.
- Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK y O'Brien RL. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (8): 5576-83.
- Rodacki M, Svoren B, Butty V, Besse W, Laffel L, Benoist C y Mathis D. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes*, **2007**; 56 (1): 177-85.
- Roder JC y Klein M. Target-effector interaction in the natural killer cell system. IV. Modulation by cyclic nucleotides. *J. Immunol.*, **1979**; 123 (6): 2785-90.
- Rodríguez-Henche N, Rodríguez-Pena MS, Guíjarro LG y Prieto JC. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**; 1221 (2): 193-8.
- Roep BO, Atkinson M y von Herrath M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.*, **2004**; 4 (12): 989-97.
- Rola-Pleszczynski M, Bolduc D y St-Pierre S. The effects of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function. *J. Immunol.*, **1985**; 135 (4): 2569-73.
- Rollins BJ. *Chemokines*. *Blood*, **1997**; 90 (3): 909-28.
- Romeo MJ, Agrawal R, Pomés A y Woodfolk JA. A molecular perspective on TH2-promoting cytokine receptors in patients with allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2014**; 133 (4): 592-60.
- Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ y Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*, **2004**; 28 (6): 311-8.
- Rosignoli F, Torroba M, Juarranz Y, García-Gómez M, Martínez C, Gomariz RP, Pérez-Leirós C y Leceta J. VIP and tolerance induction in autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2006**; 1070: 525-30.
- Rosmalen JG, van Ewijk W y Leenen PJ. T-cell education in autoimmune diabetes: teachers and students. *Trends Immunol.*, **2002**; 23 (1): 40-6.
- Rossi D y Zlotnik A. *The Biology of Chemokines and their Receptors*. *Annu. Rev. Immunol.*, **2000**; 18: 217-42.
- Rot A y von Andrian UH. *Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokine Grammar for Immune Cells*. *Annu. Rev. Immunol.*, **2004**; 22: 891-928.
- Roth PE y DeFranco AL. *Lymphocyte development. Intrinsic checkpoints for lineage progression*. *Curr. Biol.*, **1995**; 5 (4): 349-52.
- Rothe H, Burkart V, Faust A y Kolb H. Interleukin-12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, **1996**; 39 (1): 119-22.
- Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M y Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr. Rev.*, **2007**; 28 (5): 492-520.
- Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F y Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J. Immunol.*, **1993**; 150 (12): 5445-56.
- Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A y Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J. Leukoc. Biol.*, **2004**; 76 (1): 135-44.
- Rudner XL, Happel KI, Young EA y Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect. Immun.*, **2007**; 75 (6): 3055-61.
- Ruffner MA y Robbins PD. Dendritic cells transduced to express interleukin 4 reduce diabetes onset in both normoglycemic and prediabetic nonobese diabetic mice. *PLoS One*, **2010**; 5 (7): e11848.
- Ruiz-Esqueda V y Sanmartí R. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. *Reumatol. Clin.*, **2012**; 8 (6): 342-50.
- Russell MA, Cooper AC, Dhayal S y Morgan NG. Differential effects of interleukin-13 and interleukin-6 on Jak/STAT signaling and cell viability in pancreatic β -cells. *Islets*, **2013**; 5 (2): 95-105.
- Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JC, Kumar P, Qin S y Koch AE. Role of macrophage inflammatory protein-3 α and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.*, **2003**; 83 (4): 579-88.
- Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwska J y Myśliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes. *Mediators Inflamm.*, **2013**; 2013: 205284.
- Ryu S, Lee JH y Kim SI. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synovocytes. *Clin. Rheumatol.*, **2006**; 25 (1): 16-20.

-S-

Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2010**; 21 (5): 315-24.

Sachs A y Wahle E. Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J. Biol. Chem.*, **1993**; 268 (31): 22955-8.

Said SI y Dickman KG. Pathways of inflammation and cell death in the lung: modulation by vasoactive intestinal peptide. *Regul. Pept.*, **2000**; 93 (1-3): 21-9.

Said SI y Mutt V. A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **1969**; 107: 51-6.

Said SI y Mutt V. Isolation from porcine-intestinal wall of vasoactive octacosapeptide related to secretin and glucagon. *Eur. J. Biochem.*, **1972**; 28 (2): 199-204.

Said SI y Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, **1970b**; 169 (3951): 1217-8.

Said SI y Mutt V. Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature*, **1970a**; 225 (5235): 863-4.

Said SI y Rosenberg RN. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissue. *Science*, **1976**; 192 (4242): 907-8.

Said SI. The discovery of VIP: initially looked for in the lung, isolated from intestine, and identified as a neuropeptide. *Peptides*, **2007**; 28 (9): 1620-1.

Said SI. Vasoactive intestinal peptide. *J. Endocrinol. Invest.*, **1986**; 9 (2): 191-200.

Said SI. Vasoactive intestinal polypeptide: biologic role in health and disease. *Trends. Endocrinol. Metab.*, **1991**; 2 (3): 107-12.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M y Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, **1995**; 155 (3): 1151-64.

Sakakibara H, Shima K y Said SI. Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors on rat alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.*, **1994**; 267 (3 Pt 1): L256-62.

Sakane T y Suzuki N. Neuro-endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **2000**; 48 (5): 417-27.

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR y Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **1998**; 187 (6): 875-83.

Sallusto F, Zielinski CE y Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*, **2012**; 42 (9): 2215-20.

- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A y Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, **2000**; 12 (4): 431-40.
- Sanmartí R, Gómez-Centeno A, Ercilla G, Larrosa M, Viñas O, Vazquez I, Gómez-Puerta JA, Gratacós J, Salvador G y Cañete JD. Prognostic factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a two year prospective study after a structured therapeutic strategy using DMARDs and very low doses of glucocorticoids. *Clin. Rheumatol.*, **2007**; 26 (7): 1111-8.
- Santarasci V y Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavaliere D, D'Aiuto E, Cimaz R, Nebbioso A, Liotta F, De Palma R, Maggi E, Cosmi L, Romagnani S y Annunziato F. Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity*, **2012**; 36 (2): 201-14.
- Santarasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, Liotta F, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S y Annunziato F. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.*, **2009**; 39 (1): 207-15.
- Sarkar S, Cooney LA y Fox DA. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, **2010**; 159 (3): 225-37.
- Sarkar S, Cooney LA, White P, Dunlop DB, Endres J, Jorns JM, Wasco MJ y Fox DA. Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4. *Arthritis Res. Ther.*, **2009**; 11 (5): R158.
- Sarkar S, Zhou X, Justa S y Bommireddy SR. Interleukin-22 reduces the severity of collagen-induced arthritis in association with increased levels of interleukin-10. *Arthritis Rheum.*, **2013**; 65 (4): 960-71.
- Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T y Stewart T. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*, **1990**; 346 (6287): 844-7.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ y Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.*, **2006**; 203 (12): 2673-82.
- Sato K. Th17 cells and rheumatoid arthritis—from the standpoint of osteoclast differentiation. *Allergol. Int.*, **2008**; 57 (2): 109-14.
- Sawant DV, Wu H, Kaplan MH y Dent AL. The Bcl6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway. *Mol. Immunol.*, **2013**; 54 (3-4): 435-42.
- Scaldaferri L, Arora K, Lee SH, Catt KJ y Moretti C. Expression of PACAP and its type-I receptor isoforms in the rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **1996**; 117 (2): 227-32.
- Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P y Moser B. CXCL chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.*, **2000**; 192 (11): 1553-62.
- Schambach F, Schupp M, Lazar MA y Reiner SL. Activation of retinoic acid receptor-alpha favours regulatory T cell induction at the expense of IL-17-secreting T helper cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, **2007**; 37 (9): 2396-9.
- Scher JU. B-cell therapies for rheumatoid arthritis. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.*, **2012**; 70 (3): 200-3.
- Schlaak J, Hermann E, Ringhoffer M, Probst P, Gallati H, Meyer zum Büschenfelde KH y Fleischer B. Predominance of Th1-type T cells in synovial fluid of patients with Yersinia-induced reactive arthritis. *Eur. J. Immunol.*, **1992**; 22 (11): 2771-6.
- Schlegel PM, Steiert I, Kötter I y Müller CA. B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls. *PLoS One*, **2013**; 8 (12): e82580.
- Schlott NC, Hanifi-Moghaddam P, Goebel C, Shatavi SV, Flohé S, Kolb H y Rothe H. Serum IFN-gamma and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **2002**; 18 (1): 64-70.
- Schmidl C, Hansmann L, Andreesen R, Edinger M, Hoffmann P y Rehli M. Epigenetic reprogramming of the RORC locus during in vitro expansion is a distinctive feature of human memory but not naïve Treg. *Eur. J. Immunol.*, **2011**; 41 (5): 1491-8.
- Schurgers E, Billiau A y Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-γ. *J. Interferon Cytokine Res.*, **2011**; 31 (12): 917-26.
- Schutysen E, Struyf S y Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2003**; 14 (5): 409-26.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S y Kolls JK. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J. Immunol.*, **2000**; 164 (9): 4783-9.
- Scott DL, Wolfe F y Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, **2010**; 376 (9746): 1094-108.
- Segura JJ, Guerrero JM, Goberna R y Calvo JR. Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat peritoneal macrophages. *Regul. Pept.*, **1991**; 33 (2): 133-43.
- Segura JJ, Guerrero JM, Goberna R y Calvo JR. Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cyclic AMP production in rat peritoneal macrophages. *Regul. Pept.*, **1992**; 37 (3): 195-203.
- Segura JJ, Guerrero JM, López-Gonzalez MA y Calvo JR. Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits substrate adherence capacity of rat peritoneal macrophages by a mechanism that involves cAMP. *Cell. Adhes. Commun.*, **1993**; 1 (3): 213-21.
- Sekikawa A, Fukui H, Suzuki K, Karibe T, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Shiratori K, Chiba T y Fujimori T. Involvement of the IL-22/REG alpha axis in ulcerative colitis. *Lab. Invest.*, **2010**; 90 (3): 496-505.
- Sena M, Bravo DT, Von Agoston D y Waschek JA. High conservation of upstream regulatory sequences on the human and mouse vasoactive intestinal peptide (VIP) genes. *DNA Seq.*, **1994**; 5 (1): 25-9.
- Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Gerling I, Leiter EH y Shultz LD. Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I-dependent. *J. Immunol.*, **1997**; 158 (8): 3978-86.
- Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH y Shultz LD. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *J. Exp. Med.*, **1996**; 184 (5): 2049-53.
- Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH y Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, **1998**; 161 (8): 3912-8.
- Serreze DV, Gaedeke JW y Leiter EH. Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993b**; 90 (20): 9625-9.
- Serreze DV, Gaskins HR y Leiter EH. Defects in the differentiation and function of antigen presenting cells in NOD/Lt mice. *J. Immunol.*, **1993a**; 150 (6): 2534-43.
- Sethi V, Rubinstein I, Kuzmis A, Kastrissios H, Artwohl J y Onyukel H. Novel, biocompatible, and disease modifying VIP nanomedicine for rheumatoid arthritis. *Mol. Pharm.*, **2013**; 10 (2): 728-38.
- Sglunda O, Mann HF, Hulejová H, Pecha O, Pleštilová L, Růžicková O, Fojtíková M, Sléglová O, Forejtová S, Pavelka K, Vencovský J y Senolt L. Decrease in serum interleukin-21 levels is associated with disease activity improvement in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Physiol. Res.*, **2014**; 63 (4): 475-81.
- Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM 2nd y Pope RM. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, **2008**; 10 (4): R93.
- Shahrara S, Pickens SR, Dorfleutner A y Pope RM. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, **2009**; 182 (6): 3884-91.
- Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM 2nd, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK y Pope RM. IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J. Immunol.*, **2010**; 184 (8): 4479-87.
- Shao S, He F, Yang Y, Yuan G, Zhang M y Yu X. Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell Immunol.*, **2012**; 280 (1): 16-21.
- Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, Mellor AL, He Y y Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood*, **2009**; 113 (24): 6102-11.
- Sharma V, Delgado M y Ganea D. VIP protects Th2 cells by downregulating granzyme B expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2006**; 1070: 540-4.

- Shelbaya S, Amer H, Seddik S, Allah AA, Sabry IM, Mohamed T y El Mosely M. Study of the role of interleukin-6 and highly sensitive C-reactive protein in diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **2012**; 16 (2): 176-82.
- Shen H, Goodall JC y Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2009**; 60 (6): 1647-56.
- Sherwood NM, Krueckl SL y McRory JE. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.*, **2000**; 21 (6): 619-60.
- Sheward WJ, Lutz EM y Harmar AJ. The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization. *Neuroscience*, **1995**; 67 (2): 409-18.
- Shioda S, Nakai Y, Nakajo S, Nakaya K y Arimura A. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat ovary: immunohistochemistry and in situ hybridization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1996b**; 805: 677-83.
- Shioda S, Nakai Y, Nakajo S, Nakaya K y Arimura A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its type I receptors in the rat hypothalamus: neuroendocrine interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1996a**; 805: 670-6.
- Shivers BD, Gorcs TJ, Gottschall PE y Arimura A. Two high affinity binding sites for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide have different tissue distributions. *Endocrinology*, **1991**; 128 (6): 3055-65.
- Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK y Fathman CG. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science*, **1988**; 240 (4852): 659-62.
- Shreeve SM, Sreedharan SP, Hacker MP, Gannon DE y Morgan MJ. VIP activates G(s) and G(i3) in rat alveolar macrophages and G(s) in HEK293 cells transfected with the human VPAC(1) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**; 272 (3): 922-8.
- Silman A, Kay A y Brennan P. Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **1992**; 35 (2): 152-5.
- Silveira PA y Grey ST. B cells in the spotlight: innocent bystanders or major players in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2006**; 17 (4): 128-35.
- Simon AK, Seipelt E, Wu P, Wenzel B, Braun J y Sieper J. Analysis of cytokine profiles in synovial T cell clones from chlamydial reactive arthritis patients: predominance of the Th1 subset. *Clin. Exp. Immunol.*, **1993**; 94 (1): 122-6.
- Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM y Nikoosapour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *Indian J. Med. Res.*, **2013**; 138 (5): 591-4.
- Singh NP, Singh UP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M y Nagarkatti PS. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS One*, **2011**; 6 (8): e23522.
- Skyler JS y Ricordi C. Stopping type 1 diabetes: attempts to prevent or cure type 1 diabetes in man. *Diabetes*, **2011**; 60 (1): 1-8.
- Smolen JS y Emery P. Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis Res. Ther.*, **2011**; 13 Suppl 1: S2.
- Solomon GF y Moos RH. Emotions, immunity, and disease: a speculative theoretical integration. *Arch. Gen. Psychiatry*, **1964**; 11: 657-74.
- Solomon GF. Immune and nervous system interactions. Malibu: Fund for Psychoneuroimmunology, **1998**.
- Solomon GF. Psiconeuroinmunología: sinopsis de su historia, evidencia y consecuencias. Segundo Congreso Virtual de Psiquiatría, Interpsiquis 2001. Mesa redonda Psicopatología, 1 Feb.-7 Mar., **2001**.
- Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, Istrate MA, Kamenecka TM, Roush WR, Vidović D, Schürer SC, Xu J, Wagoner G, Drew PD, Griffin PR y Burris TP. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature*, **2011**; 472 (7344): 491-4.
- Sonderegger I, Iezzi G, Maier R, Schmitz N, Kurrer M y Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J. Exp. Med.*, **2008b**; 205 (10): 2281-94.
- Sonderegger I, Kisielow J, Meier R, King C y Kopf M. IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur. J. Immunol.*, **2008a**; 38 (7): 1833-8.
- Song X y Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*, **2013**; 62 (2): 175-82.
- Sonnenberg GF, Fouser LA y Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (5): 383-90.
- Sorg O y Magistretti PJ. Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *J. Neurosci.*, **1992**; 12 (12): 4923-31.
- Souza-Moreira L, Campos-Salinas J, Caro M y Gonzalez-Rey E. Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response. *Neuroendocrinology*, **2011**; 94 (2): 89-100.
- Spessert R. Vasoactive intestinal peptide stimulation of cyclic guanosine monophosphate formation: further evidence for a role of nitric oxide synthase and cytosolic guanylate cyclase in rat pinealocytes. *Endocrinology*, **1993**; 132 (6): 2513-7.
- Spolski R y Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **2008**; 26: 57-79.
- Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z y Leonard WJ. IL-21 signaling is critical for the development of type 1 diabetes in the NOD mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**; 105 (37): 14028-33.
- Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC y Goetzl EJ. Structure, expression, and chromosomal localization of the type 1 human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**; 92 (7): 2939-43.
- St Clair EW. Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **1999**; 58 Suppl 1: I99-I102.
- St Hilaire RC, Kadowitz PJ y Jeter JR Jr. Adenoviral transfer of vasoactive intestinal peptide (VIP) gene inhibits rat aortic and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Peptides*, **2009**; 30 (12): 2323-9.
- Staeve TP, Chatenoud L, Insel R y Atkinson MA. Recent lessons learned from prevention and recent-onset type 1 diabetes immunotherapy trials. *Diabetes*, **2013**; 62 (1): 9-17.
- Staeve-Vieira T, Peakman M y von Herrath M. Translational mini-review series on type 1 diabetes: Immune-based therapeutic approaches for type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.*, **2007**; 148 (1): 17-31.
- Stamp IK, Cleland LG y James MJ. Upregulation of synovial COX-2 through interactions with T lymphocytes: role of interleukin 17 and tumor necrosis factor- α . *J. Rheumatol.*, **2004**; 31 (7): 1246-54.
- Stanisz AM, Befus D y Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.*, **1986**; 136 (1): 152-6.
- Stark B, Andreae F, Mosgoeller W, Edetsberger M, Gaubitzer E, Koehler G y Prassl R. Liposomal vasoactive intestinal peptide for lung application: protection from proteolytic degradation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2008**; 70 (1): 153-64.
- Stark B, Debbage P, Andreae F, Mosgoeller W y Prassl R. Association of vasoactive intestinal peptide with polymer-grafted liposomes: structural aspects for pulmonary delivery. *Biochim Biophys Acta*, **2007**; 1768 (3): 705-14.
- Stastny P. HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **1978**; 21 (5 Suppl): S139-43.
- Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, **1976**; 57 (5): 1148-57.
- Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, Gerlitzki B, Hoffmann M, Ulges A, Taube C, Dehzad N, Becker M, Stassen M, Steinborn A, Lohoff M, Schild H, Schmitt E y Bopp T. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, **2010**; 33 (2): 192-202.
- Steiner DE, Thomas MF, Hu JK, Yang Z, Babiarz JE, Allen CD, Matloubian M, Brelloch R y Ansel KM. MicroRNA-29 Regulates T-Box Transcription Factors and Interferon- γ Production in Helper T Cells. *Immunity*, **2011**; 35 (2): 169-81.
- Stephens GL, Swerdlow B, Benjamin E, Coyle AJ, Humbles A, Kolbeck R y Fung M. IL-9 is a Th17-derived cytokine that limits pathogenic activity in organ-specific autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.*, **2011**; 41 (4): 952-62.

- Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, **2006**; 6 (4): 318-28.
- Stockinger B. Good for Goose, but not for Gander: IL-2 interferes with Th17 differentiation. *Immunity*, **2007**; 26 (3): 278-9.
- Stoffels K, Overbergh L, Giulietti A, Kasran A, Bouillon R, Gysemans C y Mathieu C. NOD macrophages produce high levels of inflammatory cytokines upon encounter of apoptotic or necrotic cells. *J. Autoimmun.*, **2004**; 23 (1): 9-15.
- Stratmann T, Apostolopoulos V, Mallet-Designe V, Corper AL, Scott CA, Wilson IA, Kang AS y Teyton L. The I-Ag7 MHC class II molecule linked to murine diabetes is a promiscuous peptide binder. *J. Immunol.*, **2000**; 165 (6): 3214-25.
- Straub RH, Buttgerit F y Cutolo M. Benefit of pregnancy in inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **2005**; 64 (6): 801-3.
- Strid J, Lopes L, Marcinkiewicz J, Petrovska L, Nowak B, Chain BM y Lund T. A defect in bone marrow derived dendritic cell maturation in the nonobesediabetic mouse. *Clin. Exp. Immunol.*, **2001**; 123 (3): 375-81.
- Stritesky GL, Muthukrishnan R, Sehra S, Goswami R, Pham D, Travers J, Nguyen ET, Levy DE y Kaplan MH. The Transcription Factor STAT3 Is Required for T Helper 2 Cell Development. *Immunity*, **2011**; 34 (1): 39-49.
- Stumhofer JS y Hunter CA. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol. Lett.*, **2008**; 117 (2): 123-30.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M y Hunter CA. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.*, **2006**; 7 (9): 937-45.
- Summers KL, Behme MT, Mahon JL y Singh B. Characterization of dendritic cells in humans with type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2003b**; 1005: 226-9.
- Summers MA, O'Dorisio MS, Cox MO, Lara-Marquez M y Goetzl EJ. A lymphocyte-generated fragment of vasoactive intestinal peptide with VPAC1 agonist activity and VPAC2 antagonist effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003a**; 306 (2): 638-45.
- Sun JC y Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, **2011**; 11 (10): 645-57.
- Sun L y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production through different molecular mechanisms in T cells activated via the T cell receptor/CD3 complex. *J. Neuroimmunol.*, **1993**; 48 (1): 59-69.
- Sutherland AP, Joller N, Michaud M, Liu SM, Kuchroo VK y Grusby MJ. IL-21 promotes CD8+ CTL activity via the transcription factor T-bet. *J. Immunol.*, **2013**; 190 (8): 3977-84.
- Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ y von Herrath M. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*, **2009**; 58 (5): 1144-55.
- Suto A, Wurster AL, Reiner SL y Grusby MJ. IL-21 inhibits IFN- γ production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J. Immunol.*, **2006**; 177 (6): 3721-7.
- Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH y Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, **2006a**; 203 (7): 1685-91.
- Sutton VR, Estella E, Li C, Chen M, Thomas HE, Kay TW y Trapani JA. A critical role for granzyme B, in addition to perforin and TNF α , in alloreactive CTL-induced mouse pancreatic beta cell death. *Transplantation*, **2006b**; 81 (2): 146-54.
- Suzuki H, Noda Y, Paul S, Gao XP y Rubinstein I. Encapsulation of vasoactive intestinal peptide into liposomes: effects on vasodilation in vivo. *Life Sci.*, **1995**; 57 (15): 1451-1457.
- Sylvester J, Liacini A, Li WQ y Zafarullah M. Interleukin-17 signal transduction pathways implicated in inducing matrix metalloproteinase-3, -13 and aggrecanase-1 genes in articular chondrocytes. *Cell. Signal.*, **2004**; 16 (4): 469-76.
- Symes A, Gearan T, Eby J y Fink JS. Integration of Jak-Stat and AP-1 signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, **1997**; 272 (15): 9648-54.
- Symes A, Lewis S, Corpus L, Rajan P, Hyman SE y Fink JS. STAT proteins participate in the regulation of the vasoactive intestinal peptide gene by the ciliary neurotrophic factor family of cytokines. *Mol. Endocrinol.*, **1994**; 8 (12): 1750-63.
- Szablewski L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.*, **2014**; 22 (1): 182-91.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG y Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, **2000**; 100 (6): 655-69.
- Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C y Fathman CG. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol.*, **2002**; 169 (5): 2461-5.
- Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G y Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, **2009a**; 42 (7): 563-73.
- Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G y Koch AE. New insights in synovial angiogenesis. *Joint Bone Spine*, **2010a**; 77 (1): 13-9.
- Szekanecz Z, Koch AE y Tak PP. Chemokine and chemokine receptor blockade in arthritis, a prototype of immune-mediated inflammatory diseases. *Neth. J. Med.*, **2011**; 69 (9): 356-66.
- Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T y Koch AE. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, **2009b**; 1: 44-51.
- Szekanecz Z, Vegvari A, Szabo Z y Koch AE. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, **2010b**; 2: 153-67.

-T-

Tachibana T, Saito ES, Takahashi H, Saito S, Tomonaga S, Boswell T y Furuse M. Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor. *Regul. Pept.*, **2004**; 120 (1-3): 99-105.

Tachiiri A, Imamura R, Wang Y, Fukui M, Umemura M y Suda T. Genomic structure and inducible expression of the IL-22 receptor alpha chain in mice. *Genes Immun.*, **2003**; 4 (2): 153-9.

Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M y Tokuhisa T. Two distinct types of T helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J. Exp. Med.*, **1978**; 147 (2): 446-58.

Takagi R, Higashi T, Hashimoto K, Nakano K, Mizuno Y, Okazaki Y y Matsushita S. B cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. *J. Immunol.*, **2008**; 181 (1): 186-9.

Takahashi N, Vanlaere I, de Rycke R, Cauwels A, Joosten LA, Lubberts E, van den Berg WB y Libert C. IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. *J. Exp. Med.*, **2008**; 205 (8): 1755-61.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW y Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.*, **2000**; 192 (2): 303-10.

Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T y Sakane T. Evidence for neural regulation of inflammatory synovial cell functions by secreting calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **1999**; 42 (11): 2418-29.

Takeda K, Kaisho T y Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **2003**; 21: 335-76.

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M y Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- β -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J. Immunol.*, **2010**; 185 (2): 842-55.

Tam EK, Franconi GM, Nadel JA y Caughey GH. Protease inhibitors potentiate smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in isolated human bronchi. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **1990**; 2 (5): 449-52.

Tams JW, Jorgensen RM, Holm A y Fahrenkrug J. Creation of a selective antagonist and agonist of the rat VPAC(1) receptor using a combinatorial approach with vasoactive intestinal peptide 6-23 as template. *Mol. Pharmacol.*, **2000**; 58 (5): 1035-41.

- Tan W, Huang W, Zhong Q y Schwarzenberger P. *IL-17 receptor knockout mice have enhanced myelotoxicity and impaired hemopoietic recovery following gamma irradiation*. J. Immunol., **2006**; 176 (10): 6186-93.
- Tanaka E y Yamanaka H. *DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs)*. Nihon Rinsho., **2013**; 71 (7): 1199-206.
- Tanaka S, Yoshimoto T, Naka T, Nakae S, Iwakura Y, Cua D y Kubo M. *Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses*. J. Immunol., **2009**; 183 (11): 7523-30.
- Tanaka Y, Maeshima K y Yamaoka K. *In vitro and in vivo analysis of a JAK inhibitor in rheumatoid arthritis*. Ann. Rheum. Dis., **2012**; 71 Suppl 2: i70-4.
- Tang B, Yong X, Xie R, Li QW y Yang SM. *Vasoactive intestinal peptide receptor-based imaging and treatment of tumors (Review)*. Int. J. Oncol., **2014**; 44 (4): 1023-31.
- Tang H, Sun L, Xin Z y Ganea D. *Down-regulation of cytokine expression in murine lymphocytes by PACAP and VIP*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **1996**; 805: 768-78.
- Tang H, Welton A y Ganea D. *Neuropeptide regulation of cytokine expression: effects of VIP and Ro 25-1553*. J. Interferon Cytokine Res., **1995**; 15 (11): 993-1003.
- Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M y Bluestone JA. *In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes*. J. Exp. Med., **2004**; 199 (11): 1455-65.
- Tanida S, Yoshitomi H, Nishitani K, Ishikawa M, Kitaori T, Ito H y Nakamura T. *CCL20 produced in the cytokine network of rheumatoid arthritis recruits CCR6+ mononuclear cells and enhances the production of IL-6*. Cytokine, **2009**; 47 (2): 112-8.
- Tarbell KV, Petit L, Zuo X, Toy P, Luo X, Mqadmi A, Yang H, Suthanthiran M, Mojsov S y Steinman RM. *Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice*. J. Exp. Med., **2007**; 204 (1): 191-201.
- Tartar DM, VanMorlan AM, Wan X, Guloglu FB, Jain R, Haymaker CL, Ellis JS, Hoeman CM, Cascio JA, Dhakal M, Oukka M y Zaghuan H. *FoxP3+RORgammat+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes*. J. Immunol., **2010**; 184 (7): 3377-85.
- Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Saeki N, Hirai A, Saito Y, Moro O y Tajima M. *Maxadilan specifically interacts with PAC1 receptor, which is a dominant form of PACAP/VIP family receptors in cultured rat cortical neurons*. Brain Res., **2001**; 889 (1-2): 138-48.
- Teresi S, Boudard F y Bastide M. *Effect of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide on murine CD4 and CD8 T cell proliferation*. Immunol. Lett., **1996**; 50 (1-2): 105-13.
- Thayer TC, Wilson SB y Mathews CE. *Use of nonobese diabetic mice to understand human type 1 diabetes*. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am., **2010**; 39 (3): 541-61.
- Theriault Y, Boulanger Y y St-Pierre S. *Structural determination of the vasoactive intestinal peptide by two-dimensional H-NMR spectroscopy*. Biopolymers, **1991**; 31 (4): 459-64.
- Thomas HE, Trapani JA y Kay TW. *The role of perforin and granzymes in diabetes*. Cell. Death Differ., **2010**; 17 (4): 577-85.
- Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Donn R, Symmons D, Hider S, Bruce IN; Wellcome Trust Case Control Consortium, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P; YEAR Consortium, Carter A, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Strachan D y Worthington J. *Rheumatoid arthritis association at 6q23*. Nat. Genet., **2007**; 39 (12): 1431-3.
- Tian J y Kaufman DL. *Antigen-based therapy for the treatment of type 1 diabetes*. Diabetes, **2009**; 58 (9): 1939-46.
- Tian J, Zekzer D, Lu Y, Dang H y Kaufman DL. *B cells are crucial for determinant spreading of T cell autoimmunity among beta cell antigens in diabetes-prone nonobese diabetic mice*. J. Immunol., **2006**; 176 (4): 2654-61.
- Toh ML, Gonzales G, Koenders MI, Tournadre A, Boyle D, Lubberts E, Zhou Y, Firestein GS, van den Berg WB y Miossec P. *Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression*. PLoS One, **2010**; 5 (10): e13416.
- Tominaga Y, Nagata M, Yasuda H, Okamoto N, Arisawa K, Moriyama H, Miki M, Yokono K y Kasuga M. *Administration of IL-4 prevents autoimmune diabetes but enhances pancreatic insulinitis in NOD mice*. Clin. Immunol. Immunopathol., **1998**; 86 (2): 209-18.
- Tompkins JD, Hardwick JC, Locknar SA, Merriam LA y Parsons RL. *Ca2+ influx, but not Ca2+ release from internal stores, is required for the PACAP-induced increase in excitability in guinea pig intracardiac neurons*. J. Neurophysiol., **2006**; 95 (4): 2134-42.
- Tornøe K, Hannibal J, Fahrenkrug J y Holst JJ. *PACAP-(1-38) as neurotransmitter in pig pancreas: receptor activation revealed by the antagonist PACAP-(6-38)*. Am. J. Physiol. **1997**; 273 (2 Pt 1): G436-46.
- Toscano MG, Delgado M, Kong W, Martin F, Skarica M y Ganea D. *Dendritic cells transduced with lentiviral vectors expressing VIP differentiate into VIP-secreting tolerogenic-like DCs*. Mol. Ther., **2010**; 18 (5): 1035-45.
- Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J y Peschon J. *Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex*. J. Immunol., **2006**; 177 (1): 36-9.
- Tran EH, Prince EN y Owens T. *IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines*. J. Immunol., **2000**; 164 (5): 2759-68.
- Trejter M, Warchol JB, de Caro R, Brelinska R, Nussdorfer GG y Malendowicz LK. *Studies on the involvement of endogenous neuropeptides in the control of thymocyte proliferation in the rat*. Histol. Histopathol., **2001**; 16 (1): 155-8.
- Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara A, Gately MK y Adorini L. *Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice*. J. Exp. Med., **1995**; 181 (2): 817-21.
- Trembleau S, Penna G, Gregori S, Chapman HD, Serreze DV, Magram J y Adorini L. *Pancreas-infiltrating Th1 cells and diabetes develop in IL-12-deficient nonobese diabetic mice*. J. Immunol., **1999**; 163 (5): 2960-8.
- Trembleau S, Penna G, Gregori S, Gately MK y Adorini L. *Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes*. Eur. J. Immunol., **1997**; 27 (9): 2330-9.
- Trembleau S, Penna G, Gregori S, Giarratana N y Adorini L. *IL-12 administration accelerates autoimmune diabetes in both wild-type and IFN-gamma-deficient nonobese diabetic mice, revealing pathogenic and protective effects of IL-12-induced IFN-gamma*. J. Immunol., **2003**; 170 (11): 5491-501.
- Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK y Spits H. *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat. Immunol., **2009**; 10 (8): 864-71.
- Trinchieri G. *Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control*. J. Exp. Med., **2007**; 204 (2): 239-43.
- Tritt M, Sgouroudis E, d'Hennezel E, Albanese A y Piccirillo CA. *Functional waning of naturally occurring CD4+ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes*. Diabetes, **2008**; 57 (1): 113-23.
- Truchetet ME, Mossalayi MD y Boniface K. *IL-17 in the rheumatologist's line of sight*. Biomed. Res. Int., **2013**; 2013: 295132.
- Tsai HC, Velichko S, Hung LY y Wu R. *IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection*. Clin. Dev. Immunol., **2013**; 2013: 267971.
- Tsukada T, Fink JS, Mandel G y Goodman RH. *Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP*. J. Biol. Chem., **1987**; 262 (18): 8743-47.
- Tsukada T, Horovitch SJ, Montminy MR, Mandel G y Goodman RH. *Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene*. DNA, **1985**; 4 (4): 293-300.
- Tsutsumi M, Claus TH, Liang Y, Li Y, Yang L, Zhu J, Dela Cruz F, Peng X, Chen H, Yung SL, Hamren S, Livingston JN y Pan CQ. *A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes*. Diabetes, **2002**; 51 (5): 1453-60.
- Tunçel N, Töre F, Sahintürk V, Ak D y Tunçel M. *Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock*. Peptides, **2000**; 21 (1): 81-9.

- Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, Sturfelt G, Nyhäll-Wählén BM, Truedsson L, Dechant SA y Matteson EL. *The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res. Ther.*, **2005**; 7 (6): R1386-93.
- Turner JT, Jones SB y Bylund DB. *A fragment of vasoactive intestinal peptide, VIP(10-28), is an antagonist of VIP in the colon carcinoma cell line, HT29*. *Peptides*, **1986**; 7 (5): 849-54.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T y Pennington DJ. *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and 2 inflammatory disease*. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**; 1843 (11): 2563-82.
- U-
- Uchida D, Tatsuno I, Tanaka T, Hirai A, Saito Y, Moro O y Tajima M. *Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1998**; 865: 253-8.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA y Gough SC. *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. *Nature*, **2003**; 423 (6939): 506-11.
- Uno S, Imagawa A, Okita K, Sayama K, Moriwaki M, Iwahashi H, Yamagata K, Tamura S, Matsuzawa Y, Hanafusa T, Miyagawa J y Shimomura I. *Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes*. *Diabetologia*, **2007**; 50 (3): 596-601.
- Usdin TB, Bonner TI y Mezey E. *Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions*. *Endocrinology*, **1994**; 135 (6): 2662-80.
- Usui T, Nishikomori R, Kitani A y Strober W. *GATA-3 Suppresses Th1 Development by Downregulation of Stat4 and Not through Effects on IL-12R2 Chain or T-bet*. *Immunity*, **2003**; 18 (3): 415-28.
- V-
- Vacas E, Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Sánchez-Chapado M, Schally AV, Prieto JC y Carmena MJ. *Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits human renal cell carcinoma proliferation*. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**; 1823 (10): 1676-85.
- Vaidya B y Pearce S. *The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies*. *Eur. J. Endocrinol.*, **2004**; 150 (5): 619-26.
- Valdehita A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Arenas MI, Vacas E, Valenzuela P, Ruiz-Villaespesa A, Prieto JC y Carmena MJ. *Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer*. *Peptides*, **2010**; 31 (11): 2035-45.
- Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM y Lipsky PE. *TNF downmodulates the function of human CD4+CD25^{hi} T-regulatory cells*. *Blood*, **2006**; 108 (1): 253-61.
- Vallabhapurapu S y Karin M. *Regulation and Function of NF-κB Transcription Factors in the Immune System*. *Annu. Rev. Immunol.*, **2009**; 27: 693-733.
- van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP y Taams LS. *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid*. *Arthritis Rheum.*, **2004**; 50 (9): 2775-85.
- van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP y Taams LS. *Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2007**; 56 (3): 732-42.
- van Belle TL, Coppieters KT y von Herrath MG. *Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies*. *Physiol. Rev.*, **2011**; 91 (1): 79-118.
- van Belle TL, Nierkens S, Arens R y von Herrath MG. *Interleukin-21 receptor-mediated signals control autoreactive T cell infiltration in pancreatic islets*. *Immunity*, **2012**; 36 (6): 1060-72.
- Van Bezooijen RL, Van Der Wee-Pals L, Papapoulos SE y Löwik CW. *Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro*. *Ann. Rheum. Dis.*, **2002**; 61 (10): 870-6.
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA y Netea MG. *Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview*. *BMB Rep.*, **2009**; 42 (12): 776-87.
- van den Berg WB. *Lessons from animal models of arthritis over the past decade*. *Arthritis Res. Ther.*, **2009**; 11 (5): 250.
- van den Brandt J, Fischer HJ, Walter L, Hünig T, Klötting I y Reichardt HM. *Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire*. *J. Immunol.*, **2010**; 185 (4): 2285-94.
- van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, Dolhain RJ y Lubberts E. *Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production*. *Arthritis Rheum.*, **2011**; 63 (1): 73-83.
- van Hamburg JP, Mus AM, de Bruijn MJ, de Vogel L, Boon L, Cornelissen F, Asmawidjaja P, Hendriks RW y Lubberts E. *GATA-3 protects against severe joint inflammation and bone erosion and reduces differentiation of Th17 cells during experimental arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2009**; 60 (3): 750-9.
- Van Rampelbergh J, Poloczek P, Francoys I, Delporte C, Winand J, Robberecht P y Waelbroeck M. *The pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP I) and VIP (PACAP II VIP1) receptors stimulate inositol phosphate synthesis in transfected CHO cells through interaction with different G proteins*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**; 1357 (2): 249-55.
- van Roon JA, Lafeber FP y Bijlsma JW. *Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **2001**; 44 (1): 3-12.
- van Tol EA, Verspaget HW, Peña AS, Jansen JB, Aparicio-Pagés MN y Lamers CB. *Modulatory effects of VIP and related peptides from the gastrointestinal tract on cell mediated cytotoxicity against tumour cells in vitro*. *Immunol. Invest.*, **1991**; 20 (3): 257-67.
- Vassiliou E, Jiang X, Delgado M y Ganea D. *TH2 lymphocytes secrete functional VIP upon antigen stimulation*. *Arch. Physiol. Biochem.*, **2001**; 109 (4): 365-8.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L y Vaudry H. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery*. *Pharmacol. Rev.*, **2009**; 61 (3): 283-357.
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A y Vaudry H. *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions*. *Pharmacol. Rev.*, **2000**; 52 (2): 269-324.
- Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A y Stockinger B. *Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells*. *J. Exp. Med.*, **2009**; 206 (1): 43-9.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorp AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC y Stockinger B. *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. *Nature*, **2008b**; 453 (7191): 106-9.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM y Stockinger B. *TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. *Immunity*, **2006**; 24 (2): 179-89.
- Veldhoen M, Uytendhoeve C, van Snick J, Helmby H, Westendorp A, Buer J, Martin B, Wilhelm C y Stockinger B. *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. *Nat. Immunol.*, **2008a**; 9 (12): 1341-6.
- Vergunst CE y Tak PP. *Chemokines: their role in rheumatoid arthritis*. *Curr. Rheumatol. Rep.*, **2005**; 7 (5): 382-8.
- Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A y Matthys P. *Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice*. *J. Immunol.*, **1997**; 158 (11): 5507-13.
- Vertongen P, Solano RM, Juarranz MG, Perret J, Waelbroeck M y Robberecht P. *Proline residue 280 in the second extracellular loop (EC2) of the VPAC2 receptor is essential for the receptor structure*. *Peptides*, **2001**; 22 (9): 1363-70.
- Vessillier S, Adams G, Montero-Melendez T, Jones R, Seed M, Perretti M y Chernajovsky Y. *Molecular engineering of short half-life small*

- peptides (VIP, aMSH and γ_3 MSH) fused to latency-associated peptide results in improved anti-inflammatory therapeutics. *Ann. Rheum. Dis.*, **2012**; 71 (1): 143-9.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL y Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, **2004**; 199 (7): 971-9.
- Vijayakrishnan L, Slavik JM, Illés Z, Greenwald RJ, Rainbow D, Greve B, Peterson LB, Hafler DA, Freeman GJ, Sharpe AH, Wicker LS y Kuchroo VK. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity*, **2004**; 20 (5): 563-75.
- Vijayan E, Samson WK, Said SI y McCann SM. Vasoactive intestinal peptide: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing hormone, and prolactin in conscious ovariectomized rats. *Endocrinology*, **1979**; 104 (1): 53-7.
- Vivier E y Ugolini S. Natural killer cells: from basic research to treatments. *Front. Immunol.*, **2011**; Jun 3;2:18.
- Vogelzang A, McGuire hm, Yu D, Jonathan Sprent J, Mackay CR y King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity*, **2008**; 29 (1): 127-37.
- Voice J, Donnelly S, Dorsam G, Dolganov G, Paul S y Goetzl EJ. *c-Maf* and *JunB* mediation of Th2 differentiation induced by the type 2 G protein-coupled receptor (VPAC2) for vasoactive intestinal peptide. *J. Immunol.*, **2004**; 172 (12): 7289-96.
- Voice JK, Grininger C, Kong Y, Bangale Y, Paul S y Goetzl EJ. Roles of vasoactive intestinal peptide (VIP) in the expression of different immune phenotypes by wild-type mice and T cell-targeted type II VIP receptor transgenic mice. *J. Immunol.*, **2003**; 170 (1): 308-14.
- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E y Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.*, **2008**; 9 (6): 650-7.
- Vomhof-DeKrey EE, Haring JS y Dorsam GP. Vasoactive intestinal peptide receptor 1 is downregulated during expansion of antigen-specific CD8 T cells following primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections. *J. Neuroimmunol.*, **2011**; 234 (1-2): 40-8.
- Vomhof-DeKrey EE, Hermann RJ, Palmer MF, Benton KD, Sandy AR, Dorsam ST y Dorsam GP. TCR signaling and environment affect vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VPAC-1) expression in primary mouse CD4 T cells. *Brain Behav. Immun.*, **2008**; 22 (7): 1032-40.
- von Herrath M, Peakman M y Roep B. Progress in immune-based therapies for type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.*, **2013**; 172 (2): 186-202.
- Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR y Liu YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106 (12): 4793-8.
- Vuckovic S, Withers G, Harris M, Khalil D, Gardiner D, Flesch I, Tepes S, Greer R, Cowley D, Cotterill A y Hart DN. Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children. *Clin. Immunol.*, **2007**; 123 (3): 281-8.
- Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ y Katz JD. Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol. Genomics*, **2005**; 21 (2): 201-11.
- W-
- Waelbroeck M, Robberecht P, Coy DH, Camus JC, De Neef P y Christophe J. Interaction of growth hormone-releasing factor (GRF) and 14 GRF analogs with vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors of rat pancreas. Discovery of (N-Ac-Tyr1,D-Phe2)-GRF(1-29)-NH2 as a VIP antagonist. *Endocrinology*, **1985**; 116 (6): 2643-9.
- Wällberg M y Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.*, **2013**; 34 (12): 583-91.
- Walsh GM, Hartnell A, Wardlaw AJ, Kurihara K, Sanderson CJ y Kay AB. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology*, **1990**; 71 (2): 258-65.
- Walsh KP y Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarization. *Trends Immunol.*, **2013**; 34 (11): 521-30.
- Walter GJ, Evans HG, Menon B, Gullick NJ, Kirkham BW, Cope AP, Geissmann F y Taams LS. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4+CD45ro+CD25+CD127(low) regulatory T cells. *Arthritis Rheum.*, **2013**; 65 (3): 627-38.
- Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, **2010**; 130 (2): 166-71.
- Wang B, Gonzalez A, Benoist C y Mathis D. The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Immunol.*, **1996**; 26 (8): 1762-9.
- Wang B, Gonzalez A, Höglund P, Katz JD, Benoist C y Mathis D. Interleukin-4 deficiency does not exacerbate disease in NOD mice. *Diabetes*, **1998**; 47 (8): 1207-11.
- Wang C, Zhou XJ, Li YY, Wan J, Yang LY y Li GH. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on NKG2D signal pathway and its contribution to immune escape of MKN45 cells. *Scientific World Journal*, **2013**; 2013: 429545.
- Wang HY, Jiang X, Gozes I, Fridkin M, Brennenman DE y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits cytokine production in T lymphocytes through cAMP-dependent and cAMP-independent mechanisms. *Regul. Pept.*, **1999**; 84 (1-3): 55-67.
- Wang HY, Jiang XM y Ganea D. The neuropeptides VIP and PACAP inhibit IL-2 transcription by decreasing c-Jun and increasing JunB expression in T cells. *J. Neuroimmunol.*, **2000**; 104 (1): 68-78.
- Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD y Snyder SH. Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**; 101 (8): 2631-5.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR y Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.*, **2007**; 25: 821-52.
- Weaver DJ Jr, Poligone B, Bui T, Abdel-Motal UM, Baldwin AS Jr y Tisch R. Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF-kappa B regulation due to a hyperactive I kappa B kinase. *J. Immunol.*, **2001**; 167 (3): 1461-8.
- Wehrens EJ, Mijnheer G, Duurland CL, Klein M, Meerding J, van Loosdregt J, de Jager W, Sawitzki B, Coffey PJ, Vastert B, Prakken BJ y van Wijk F. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood*, **2011**; 118 (13): 3538-48.
- Wei B y Pei G. microRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol. Immunol.*, **2010**; 7 (3): 175-81.
- Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT, Schones DE, Peng W, Sun HW, Paul WE, O'Shea JJ y Zhao K. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity*, **2009**; 30 (1): 155-67.
- Wei L, Laurence A, Elias KM y O'Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J. Biol. Chem.*, **2007**; 282 (48): 34605-10.
- Wei WC, Su YH, Chen SS, Sheu JH y Yang NS. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine*, **2011**; 55 (1): 79-89.
- Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV y Grossbard E. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.*, **2008**; 58 (11): 3309-18.
- Weinstock JV y Blum AM. Detection of vasoactive intestinal peptide and localization of its mRNA within granulomas of murine schistosomiasis. *Cell. Immunol.*, **1990**; 125 (2): 291-300.
- Wenzlau JM y Hutton JC. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.*, **2013**; 13 (5): 608-15.
- Werner JL, Metz AE, Horn D, Schoeb TR, Hewitt MM, Schwiebert LM, Faro-Trindade I, Brown GD y Steele C. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Immunol.*, **2009**; 182 (8): 4938-46.
- Wernig K, Griesbacher M, Andreae F, Hajos F, Wagner J, Mosgoeller W y Zimmer A. Depot formulation of vasoactive intestinal peptide by

- protamine-based biodegradable nanoparticles. *J. Control Release*, **2008**; 130 (2): 192-8.
- Weyand CM y Goronzy JJ. Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2003**; 987: 140-9.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL y Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.*, **1992**; 117 (10): 801-6.
- Wicker LS, Miller BJ y Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, **1986**; 35 (8): 855-60.
- Wiik P, Haugen AH, Løvhaug D, Bøyum A y Opstad PK. Effect of VIP on the respiratory burst in human monocytes *ex vivo* during prolonged strain and energy deficiency. *Peptides*, **1989**; 10 (4): 819-23.
- Wiik P, Opstad PK y Bøyum A. Binding of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by human blood monocytes: demonstration of specific binding sites. *Regul. Pept.*, **1985**; 12 (2): 145-53.
- Wiik P. Vasoactive intestinal peptide inhibits the respiratory burst in human monocytes by a cyclic AMP-mediated mechanism. *Regul. Pept.*, **1989**; 25 (2): 187-97.
- Wiik P. VIP inhibition of monocyte respiratory burst *ex vivo* during prolonged strain and energy deficiency. *Int. J. Neurosci.*, **1990**; 51 (3-4): 195-6.
- Wilgus TA, Roy S y McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, **2013**; 2 (7): 379-88.
- Williams RO. Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2002**; 46 (1): 271-3.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP y de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.*, **2007**; 8 (9): 950-7.
- Winzell MS y Ahrén B. G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol. Ther.*, **2007**; 116 (3): 437-48.
- Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R y Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2010**; 21 (5): 365-79.
- Wolford JK y Signs SA. Binding of sequence-specific proteins to the 3'-untranslated region of vasoactive intestinal peptide mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**; 211(3): 819-25.
- Wolk K y Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2006**; 17 (5): 367-80.
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K y Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, **2004**; 21 (2): 241-54.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W y Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.*, **2006**; 36 (5): 1309-23.
- Wollman Y, Blumberg S, Spungin A, Brennen DE, Fridkin M, Wollman J, Iaina A y Gozes I. The increased proliferation of cultured neuroblastoma cells treated with vasoactive intestinal peptide is enhanced by simultaneous inhibition of neutral endopeptidase. *Regul. Pept.*, **2002**; 108 (2-3): 175-7.
- Wong FS y Janeway CA Jr. The role of CD4 vs. CD8 T cells in IDDM. *J. Autoimmun.*, **1999**; 13 (3): 290-5.
- Wong FS y Wen L. B cells in autoimmune diabetes. *Rev. Diabet. Stud.*, **2005**; 2 (3): 121-35.
- Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA y Janeway CA Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J. Exp. Med.*, **1996**; 183 (1): 67-76.
- Wooten D, Lindmark H, Kadmiel M, Willcockson H, Caron KM, Barwell J, Drmotá T y Poyner DR. Receptor activity modifying proteins (RAMPs) interact with the VPAC2 receptor and CRF1 receptors and modulate their function. *Br. J. Pharmacol.*, **2013**; 168 (4): 822-34.
- Wright GP, Notley CA, Xue SA, Bendle GM, Holler A, Schumacher TN, Ehrenstein MR y Stauss HJ. Adoptive therapy with redirected primary regulatory T cells results in antigen-specific suppression of arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**; 106 (45): 19078-83.
- Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, Tomkinson KN, Fitz LJ, Wolfman NM, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K, Chatterjee-Kishore M y Carreno BM. The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J. Immunol.*, **2008**; 181 (4): 2799-805.
- Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM y Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect.*, **2007**; 9 (1): 78-86.
- Wu Q, Salomon B, Chen M, Wang Y, Hoffman LM, Bluestone JA y Fu YX. Reversal of spontaneous autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by soluble lymphotoxin receptor. *J. Exp. Med.*, **2001**; 193 (11): 1327-32.
- Wu YL, Ding YP, Gao J, Tanaka Y y Zhang W. Risk factors and primary prevention trials for type 1 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.*, **2013**; 9 (7): 666-79.
- Wynn TA y Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin. Liver. Dis.*, **2010**; 30 (3): 245-57.
- Wynn TA, Chawla A y Pollard JW. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, **2013**; 496 (7446): 445-55.

-X-

Xia M, Sreedharan SP, Bolin DR, Gaufo GO y Goetzl EJ. Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**; 281 (2): 629-33.

Xiao C y Rajewsky K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell*, **2009**; 136 (1): 26-36.

Xiao H, Wang S, Miao R y Kan W. TRAIL is associated with impaired regulation of CD4+CD25- T cells by regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.*, **2011**; 31 (6): 1112-9.

Xiao S, Jin H, Korn T, Liu SM, Oukka M, Lim B y Kuchroo VK. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J. Immunol.*, **2008**; 181 (4): 2277-84.

Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD y Gurney AL. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J. Biol. Chem.* **2000**; 275 (40): 31335-9.

Xin Z y Sriram S. Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-12 and nitric oxide production in murine macrophages. *J. Neuroimmunol.*, **1998**; 89 (1-2): 206-12.

Xin Z, Jiang X, Wang HY, Denny TN, Dittel BN y Ganea D. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on cytokine production and expression of VIP receptors in thymocyte subsets. *Regul. Pept.*, **1997**; 72 (1): 41-54.

Xin Z, Tang H y Ganea D. Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production in murine thymocytes activated via the TCR/CD3 complex. *J. Neuroimmunol.*, **1994**; 54 (1-2): 59-68.

Xu J, Yang Y, Qiu G, Lal G, Wu Z, Levy DE, Ochando JC, Bromberg JS y Ding Y. c-Maf regulates IL-10 expression during Th17 polarization. *J. Immunol.*, **2009**; 182 (10): 6226-36.

Xu L, Kitani A, Fuss I y Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J. Immunol.*, **2007**; 178 (11): 6725-9.

Xu S y Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol. Immunol.*, **2010**; 7 (3): 164-74.

Xu T, Wang X, Zhong B, Nurieva RI, Ding S y Dong C. Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of RORgamma t protein. *J. Biol. Chem.*, **2011**; 286 (26): 22707-10.

Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, Dillon SR, Gao Z, Gilbert T, Madden K, Schlusmeyer S, Yao L, Whitmore TE, Chandrasekhar Y, Grant FJ, Maurer M, Jelinek L, Storey H, Brender T, Hammond A, Topouzis S, Clegg CH y Foster DC. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**; 98 (17): 9511-6.

Xu X, Zheng S, Yang F, Shi Y, Gu Y, Chen H, Zhang M y Yang T. Increased Th22 cells are independently associated with Th17 cells in type 1 diabetes. *Endocrine*, **2014**; 46 (1): 90-8.

-Y-

- Yadav M y Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide-mediated Th17 differentiation: an expanding spectrum of vasoactive intestinal peptide effects in immunity and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**; 1144: 83-9.
- Yadav M, Huang MC y Goetzl EJ. VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis. *Cell. Immunol.*, **2011**; 267 (2): 124-32.
- Yadav M, Rosenbaum J y Goetzl EJ. Cutting edge: vasoactive intestinal peptide (VIP) induces differentiation of Th17 cells with a distinctive cytokine profile. *J. Immunol.*, **2008**; 180 (5): 2772-6.
- Yago T, Nanke Y, Kawamoto M, Furuya T, Kobashigawa T, Kamatani N y Kotake S. IL-23 induces human osteoclastogenesis via IL-17 in vitro, and anti-IL-23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Res. Ther.*, **2007**; 9 (5): R96.
- Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JJ, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y y Yoshikai Y. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **2008**; 67 (9): 1299-304.
- Yamaguchi T y Sakaguchi S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin. Cancer Biol.*, **2006**; 16 (2): 115-23.
- Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K y Yamamoto K. IL-17B and IL-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J. Immunol.*, **2007**; 179 (10): 7128-36.
- Yamaguchi Y, Suda T, Ohta S, Tominaga K, Miura Y y Kasahara T. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils. *Blood*, **1991**; 78 (10): 2542-7.
- Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tominaga A y Takatsu K. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J. Exp. Med.*, **1988**; 167 (1): 43-56.
- Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, Martin-Orozco N, Kang HS, Ma L, Panopoulos AD, Craig S, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q y Dong C. CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, **2008**; 181 (12): 8391-401.
- Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W y Murphy KM. IL-18-stimulated GADD45 β required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN- γ production. *Nat. Immunol.*, **2001**; 2 (2): 157-64.
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK y Hafler DA. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature*, **2008a**; 454 (7202): 350-2.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS y Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.*, **2007**; 282 (13): 9358-63.
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM y Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, **2008b**; 28 (1): 29-39.
- Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, Sun HW, Wei L, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ y Laurence A. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat. Immunol.*, **2011**; 12 (3): 247-54.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JJ y Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, **1995a**; 3 (6): 811-21.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK y Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.*, **1995b**; 155 (12): 5483-6.
- Yaochite JN, Calia-Oliveira C, Davanzo MR, Carlos D, Malmegrim KC, Cardoso CR, Ramalho LN, Palma PV, da Silva JS, Cunha FQ, Covas DT y Voltarelli JC. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. *Immunobiology*, **2013**; 218 (3): 338-52.
- Yazici Y y Regens AL. Promising new treatments for rheumatoid arthritis - the kinase inhibitors. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.*, **2011**; 69 (3): 233-7.
- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenberger P, Shellito JE y Kolls JK. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2001a**; 25 (3): 335-40.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.*, **2001b**; 194 (4): 519-27.
- Yi JS, Cox MA y Zajac AJ. Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections. *Microbes Infect.*, **2010**; 12 (14-15): 1111-9.
- Yiangou Y, Serrano R, Bloom SR, Peña J y Festenstein H. Effects of prepro-vasoactive intestinal peptide-derived peptides on the murine immune response. *J. Neuroimmunol.*, **1990**; 29 (1-3): 65-72.
- Yin H, Cheng H, Yu M, Zhang F, Lin J, Gao Y, Han B y Zhu L. Vasoactive intestinal peptide ameliorates synovial cell functions of collagen-induced arthritis rats by down-regulating NF-kappaB activity. *Immunol. Invest.*, **2005**; 34 (2): 153-69.
- Yoshihara Y y Yamada H. Matrix metalloproteinases and cartilage matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Clin. Calcium*, **2007**; 17 (4): 500-8.
- You S, Belghith M, Cobbold S, Alyanakian MA, Gouarin C, Barriot S, Garcia C, Waldmann H, Bach JF y Chatenoud L. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes*, **2005**; 54 (5): 1415-22.
- You W, Tang Q, Zhang C, Wu J, Gu C, Wu Z y Li X. IL-26 promotes the proliferation and survival of human gastric cancer cells by regulating the balance of STAT1 and STAT3 activation. *PLoS One*, **2013**; 8 (5): e63588.
- Young DA, Hegen M, Ma HL, Whitters MJ, Albert LM, Lowe L, Senices M, Wu PW, Sibley B, Leathurby Y, Brown TP, Nickerson-Nutter C, Keith JC Jr y Collins M. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2007**; 56 (4): 1152-63.
- Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, Ellyard JJ, Parish IA, Ma CS, Li QJ, Parish CR, Mackay CR y Vinuesa CG. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*, **2009**; 31 (3): 457-68.
- Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, Evans RT y Gaffen SL. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*, **2007a**; 109 (9): 3794-802.
- Yu R, Zhang H, Huang L, Liu X y Chen J. Anti-hyperglycemic, antioxidant and anti-inflammatory effects of VIP and a VPAC1 agonist on streptozotocin-induced diabetic mice. *Peptides*, **2011**; 32 (2): 216-22.
- Yu RJ, Tam NL, Gao Y, Zeng ZH, Zhou TH y Hong A. A novel recombinant, VPAC2-selective agonist enhancing insulin release and glucose disposal. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2007b**; 28 (4): 526-33.
- Yu RJ, Xie QL, Dai Y, Gao Y, Zhou TH y Hong A. Intein-mediated rapid purification and characterization of a novel recombinant agonist for VPAC2. *Peptides*, **2006**; 27 (6): 1359-66.
- Yuan FL, Hu W, Lu WG, Li X, Li JP, Xu RS, Li CW, Chen FH y Jin C. Targeting interleukin-21 in rheumatoid arthritis. *Mol. Biol. Rep.*, **2011**; 38 (3): 1717-21.
- Yung SL, Dela Cruz F, Hamren S, Zhu J, Tsutsumi M, Bloom JW, Caudle M, Rocznik S, Todd T, Lemoine L, MacDougall M, Shanafelt AB y Pan CQ. Generation of highly selective VPAC2 receptor agonists by high throughput mutagenesis of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J. Biol. Chem.*, **2003**; 278 (12): 10273-81.

-Z-

- Zaccone P, Phillips J, Conget I, Gomis R, Haskins K, Minty A, Bendtzen K, Cooke A y Nicoletti F. Interleukin-13 prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, **1999**; 48 (8): 1522-8.
- Zafirova Y, Yordanov M y Kalfin R. Antiarthritic effect of VIP in relation to the host resistance against *Candida albicans* infection. *Int. Immunol.*, **2004**; 16 (8): 1125-31.
- Zenewicz LA y Flavell RA. IL-22 and inflammation: leukin' through a glass onion. *Eur. J. Immunol.*, **2008**; 38 (12): 3265-8.

- Zenewicz LA y Flavell RA. *Recent advances in IL-22 biology*. Int. Immunol., **2011**; 23 (3): 159-63.
- Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE y Leonard WJ. *The molecular basis of IL-21-mediated proliferation*. Blood, **2007**; 109 (10): 4135-42.
- Zeng WP. 'All things considered': transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation. Immunology, **2013**; 140 (1): 31-8.
- Zhang F, Meng G y Strober W. *Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells*. Nat. Immunol., **2008**; 9 (11): 1297-306.
- Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, Kamoun M y Rostami A. *Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system*. J. Immunol., **2003**; 170 (4): 2153-60.
- Zhang J, Huang Z, Sun R, Tian Z y Wei H. *IFN- γ induced by IL-12 administration prevents diabetes by inhibiting pathogenic IL-17 production in NOD mice*. J. Autoimmun., **2012b**; 38 (1): 20-8.
- Zhang L y Eisenbarth GS. *Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus*. J. Diabetes, **2011**; 3 (1): 48-57.
- Zhang L, Li JM, Liu XG, Ma DX, Hu NW, Li YG, Li W, Hu Y, Yu S, Qu X, Yang MX, Feng AL y Wang GH. *Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis*. J. Clin. Immunol., **2011**; 31 (4): 606-14.
- Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, Ma DX, Li ZF, Yang Q, Li W y Li JM. *Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis*. PLoS One, **2012a**; 7 (4): e31000.
- Zhang LQ y Shen JG. *Experiment treatment of collagen-induced arthritis in rats with recombinant plasmid containing vasoactive intestinal peptide gene*. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, **2006b**; 35 (4): 403-10.
- Zhang YC, Yang LP, Tang DH y Zhang YM. *Protective effects of vasoactive intestinal peptide on intestinal lesions induced by endotoxin shock in rat*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, **2006a**; 44 (5): 369-73.
- Zhang Z, Clarke TB y Weiser JN. *Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice*. J. Clin. Invest., **2009**; 119 (7): 1899-909.
- Zhang Z, Ding Y, Li W, Song B y Yang R. *Interleukin-17A- or tumor necrosis factor α -mediated increase in proliferation of T cells cocultured with synovium-derived mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res. Ther., **2013**; 15 (5): R169.
- Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Zhang Y, Feng L y Wang K. *IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis*. Int. J. Rheum. Dis., **2013**; 16 (5): 518-26.
- Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT, Corcoran L, Treuting P, Klein U y Rudensky AY. *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses*. Nature, **2009**; 458 (7236): 351-6.
- Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J y Ouyang W. *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. Nature, **2007**; 445 (7128): 648-51.
- Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K y Rudensky AY. *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, **2010**; 463 (7282): 808-12.
- Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ y Ouyang W. *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat. Med., **2008**; 14 (3): 282-9.
- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ y Littman DR. *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat. Immunol., **2007**; 8 (9): 967-74.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF y Littman DR. *TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function*. Nature, **2008**; 453 (7192): 236-40.
- Zhu J y Paul WE. *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, **2008**; 112 (5): 1557-69.
- Zhu J, Yamane H y Paul WE. *Differentiation of effector CD4 T cell populations*. Annu. Rev. Immunol., **2010**; 28: 445-89.
- Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L y Paul WE. *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors*. Cell Research, **2006**; 16 (1): 3-10.
- Zhu S y Qian Y. *IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential*. Clin. Sci. (Lond.), **2012**; 122 (11): 487-511.
- Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A y Sallusto F. *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β* . Nature, **2012**; 484 (7395): 514-8.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H y Maslinski W. *High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism*. J. Immunol., **2000**; 164 (5): 2832-8.
- Zipris D y Karnieli E. *A single treatment with IL-4 via retrovirally transduced lymphocytes partially protects against diabetes in BioBreeding (BB) rats*. JOP, **2002**; 3 (3): 76-82.
- Zizzo G, De Santis M, Bosello SL, Fedele AL, Peluso G, Gremese E, Toluoso B y Ferraccioli G. *Synovial fluid-derived T helper 17 cells correlate with inflammatory activity in arthritis, irrespectively of diagnosis*. Clin. Immunol., **2011**; 138 (1): 107-16.
- Zorzi F, Monteleone I, Sarra M, Calabrese E, Marafini I, Cretella M, Sedda S, Biancone L, Pallone F y Monteleone G. *Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease*. PLoS One, **2013**; 8 (1): e54562.
- Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis MA y Miossec P. *Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes*. J. Immunol., **2009**; 182 (5): 3112-20.
- Zrioual S, Toh ML, Tournadre A, Zhou Y, Cazalis MA, Pachot A, Miossec V y Miossec P. *IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood*. J. Immunol., **2008**; 180 (1): 655-63.
- Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C y Mathis D. *Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics*. Immunity, **2005**; 22 (3): 385-96.
- Zúñiga LA, Jain R, Haines C y Cua DJ. *Th17 cell development: from the cradle to the grave*. Immunol. Rev., **2013**; 252 (1): 78-88.

Resumen en inglés

Effect of Vasoactive intestinal peptide on Th17 lymphocytes and its relationship to other Th subpopulations: involvement in autoimmune/inflammatory diseases

T helper (Th) cells have been classified into different functional subsets, each characterized by its specific cytokine pattern and effector function. Although there are four major lineages, referred as Th1, Th2, Th17 and induced T-regulatory (iTreg) cells, other Th lineages could be regarded as T follicular helper (Tfh), Th9 or Th22 subsets. Classically, it has been considered that each subset was terminally differentiated, however recent evidences suggest that under certain conditions, seemingly committed Th cells possess plasticity and may convert into other types of effector cells. This new concept suggests that analyses of relationships between different subsets are more important.

Th17 cells are considered a major link between innate and adaptive immune responses, having a critical role in normal host defence. Th17 cells are able to clear pathogens that are less efficiently resolved by Th1 or Th2. The cytokine signature profile of Th17 cells is formed by several cytokines such as interleukin (IL)-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22. Th17 cells are also characterized by the expression of chemokine receptors such as CCR6 and cytokine receptors such as IL-23R and IL-21R. Moreover, Th17 cells can secrete at lower levels interferon gamma (IFN- γ), IL-10, IL-9, IL-2, and other cytokines. The final effector functions of Th17 cells depend on the specific combination of the cytokines produced. Increasing evidence points to phenotypic heterogeneity of these cells. It has been suggested that Th17 cells may exhibit a pathogenic or non-pathogenic phenotype according to their cytokine secretion profile. Pathogenic Th17 cells secrete IL-17, IL-21, IL-22, IL-2, IFN γ and GM-CSF and non-pathogenic Th17 cells secrete IL-17, IL-21, IL-9 and IL-10. Moreover, epigenetic studies have shown that the Th17 subset is a less committed lineage when compared to Th1 and Th2 cells. Th17 cells are reported to exhibit a high degree of phenotypic instability and plasticity, which enable them to acquire other Th phenotype. Mostly, it has been described that Th17 cells are susceptible to change into Th1 subset. This conversion has been related to pathogenic function of these cells.

Th17 cells have also been associated with diverse autoimmune diseases, such as Type 1 diabetes (T1D) or Rheumatoid arthritis (RA). T1D is an autoimmune disease that results from the destruction of pancreatic insulin-producing β -cells. The autoimmune response is believed to be due to a breakdown of immunological tolerance, resulting in a lack of immunoregulation of autoreactive diabetogenic T cells. The nonobese diabetic (NOD) mouse is a strain that is genetically prone to develop different, organspecific, autoimmune diseases. It has been a very useful model for studying the mechanisms involved in the initiation and propagation of T1D, and specifically the Th role in the development of the disease. The Th1 subset is thought to be a crucial player in T1D. However, it is believed that Th17 cells orchestrate inflammation and immunity in several autoimmune diseases. It has recently been found that progression from insulinitis to diabetes correlates with the expression of IL-17 in the pancreas, suggesting that Th17 cells have a pathological role in the development of T1D. On the other hand, RA is an autoimmune disease that results in chronic inflammation and tissue damage in the joints. The role of different autoreactive T cell subsets in the pathogenesis of RA has been the subject of

an intense debate. Once attributed to Th1 arthritogenic cells, the subsequent discovery of the Th17 subset indicated a central role for these cells in this pathology, recently becoming a target for the treatment of the disease. Studies exploring the neutralization of IL-17 by antibodies or using IL-17-deficient mice showed that this cytokine is involved in the autoimmune collagen-induced arthritis (CIA) model. In humans, existing studies suggest that Th17 cells and their related cytokines play an important role in the pathogenesis of RA and its number in peripheral blood is associated with disease activity. Moreover, IL-17 levels are increased in the synovial fluid of RA patients. This cytokine, through its specific receptors, is able to modulate the function of other cells in the joint such as fibroblast-like synoviocytes (FLS), macrophages, chondrocytes and osteoclasts. Thereby, IL-17 is a key orchestrator of RA chronicity.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a 28 aminoacid neuropeptide first isolated by Said and Mutt that belongs to the secretin family. This neuropeptide is widely distributed in the central and peripheral nervous system, and it is produced by several endocrine and immune cells, including T cells. Its action is mediated by three heterotrimeric G-protein-coupled receptors, VIP and PACAP receptor type I (VPAC₁), VIP and PACAP receptor type II (VPAC₂) and PACAP receptor type I (PAC₁). It is able of eliciting a broad spectrum of biological actions, modulating both innate and adaptive immunity. Predominantly, it shows an anti-inflammatory function. VIP modulates the generation and function of different CD4 T cell subsets. It is well known that it decreases Th1 responses, increases Th2 response and promotes T-regulatory functions in both *in vivo* and *in vitro* studies. On Th17 cells, the results are opposing. It has been described that VIP inhibits the Th17 response in autoimmunity, while it has been published that VIP promotes the *in vitro* Th17 differentiation in mice.

An increasing body of *in vivo* data indicates that administration of VIP may have promising outcomes in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, RA, Sjogren's syndrome and Crohn's disease. Related to T1D, previous reports indicate that VIP also prevents diabetes development in NOD mice, reducing circulating levels of Th1 cytokines and increasing markers for regulatory T cells. On the other hand, it has been shown that this neuropeptide prevents the development of CIA through its anti-inflammatory and immunomodulatory actions. In human RA, VIP is present in the joint microenvironment and its therapeutic effects have been supported by several studies. Recently, circulating VIP levels have been described as a prognostic biological marker predicting the evolution of early RA patients.

Given the crucial role of Th17 cells in the development of inflammatory response in both diseases, it is important to know the regulatory mechanisms involved in their differentiation, proliferation, and function. Therefore it is very interesting to know the potential modulation of VIP on Th17 cells. Study of the effect of VIP on Th17 subset could be important for the design of therapies to autoimmune diseases such as T1D or RA diseases. Taking account this hypothesis and the above mentioned evidences, the **aims of this Doctoral Thesis** are the following:

1. To study the effect of VIP on the *in vitro* activation of Th17 memory and other murine and human CD4 T subpopulations. We analysed the VIP function on the generation of different Th responses after *in vitro* activation of CD4 T lymphocytes from Balb/c mouse. We also characterized the VPAC₁ and VPAC₂ receptors expression and the VIP effect on human memory Th cells from peripheral blood of healthy donors after their *in vitro* activation.
2. To analyse the effect of VIP on the *in vitro* differentiation of human Th17 cells from naïve CD4 T lymphocytes from umbilical cord, characterizing also the VPAC₁ and VPAC₂ receptors expression.
3. To examine the effect of VIP on the *in vitro* polarization towards Th17 subpopulation of human memory CD4 T cells from peripheral blood of healthy donors, characterizing the VPAC₁ and VPAC₂ receptors expression.
4. To determine the *in vivo* effect of VIP on different CD4 T subpopulations in the experimental model of autoimmune diabetes NOD, characterizing the Th17 and other Th responses and the balances between different Th subpopulations.
5. To compare the Th17 profile of activated memory Th cells from RA patients with memory cells from healthy donors.
6. To compare the Th17 profile of polarized memory Th cells from RA patients towards Th17 subsets with cells from healthy donors.
7. To analyse the effect of VIP *ex vivo* on memory Th17 cells and other Th subpopulations from peripheral blood of patients with early RA, after *in vitro* activation and after their *in vitro* polarization towards Th17 subset. We also characterized the VPAC₁ and VPAC₂ receptors expression in these cells.

In order to get these aims, *in vitro* studies were performed after cell isolation. In murine studies we isolated splenocytes and activated/expanded them during five days. In the case of human memory cells from healthy donors or RA patients, we isolate CD4 and CD45RO double positive T cells from peripheral blood and cultured them during 7 days under activation/expansion or polarization into Th17 subset conditions. For human Th17 differentiation analysis, we isolated CD4 and CD45RA double positive T cells from cord blood and cultured them under Th17 differentiation conditions during 7 days. All studies were made in two situations: presence or absence of VIP. After cultures, immunocytochemical analysis, proliferation analysis, real time PCR, enzymeimmunoassay and flow cytometric analysis were performed. On the other hand, *in vivo* analysis of the VIP effect on Th cells from NOD mice was made through samples extraction of pancreas and spleen of diabetic mice, which were treated or not with the peptide. Analyses were made during the disease development until 30 weeks of age. Cells or RNA were extracted from pancreas or spleen and cytometry studies or real time PCR were performed.

Summarized results show that VIP modulates Th cells and specifically Th17 subset in both murine and human, as well as in healthy and in diabetic or arthritic pathologies. First, we analysed the VIP function on *in vitro* activated murine and human Th cells. Related to the **VIP effect on murine activated Th cells**, our results indicate that VIP is able to differentially modulate the diverse Th

subpopulations. On Th17 subset, this neuropeptide shows adverse effects on their functionality. Likewise, on Th1 cells, we observed that VIP has a negative influence on the Th1 function. Considering both subpopulations, the presence of VIP increased the cytokines and transcription factors typically related to Th17 cells over those of the Th1 cell subset in activated splenocytes. About Th2, we could not conclude a specific effect of the neuropeptide. However, we detected that VIP increases the Th2 function over the Th1 and Th9 functions. On the other hand, we observed that, in the absence of IL-2, VIP is able to increase the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells in activated splenocytes. Moreover, VIP decreases the iTreg/Th17 and the iTreg/Th1 balances in activated splenocytes. In conclusion, our data using activated splenocytes from healthy mice as *ex vivo* model show that VIP modulates the balances between different Th subsets, being this the first study showing that VIP also affects Th2/Th9 and iTreg/Th1 ratios.

Related to the **VIP effect on human activated Th cells**, our data show that VIP inhibits the functional Th17 response over *in vitro* activated Th lymphocytes. Moreover, the phenotypic analysis of these cells showed that the neuropeptide was able to reduce the pathogenic and phenotype of these cells, decreasing the expression of pathogenic markers and increasing the expression of cytokines related to the non-pathogenic profile. Likewise, VIP was able to decrease the Th17/1 profile of these cells.

On the other hand, we checked the **VIP effect on the *in vitro* differentiation of naïve Th cells into Th17 subset**. Our data point that VIP promotes the human Th17 differentiation through VPAC₁ and VPAC₂ receptors. During Th17 differentiation the expression of both receptors is changed, showing an increase in VPAC₂/VPAC₁ ratio in Th17 differentiated cells. On these cells, VIP increases their proliferation rate and maintains their potential capacity of migration in response to CCL20. About the profile of Th17 differentiated cells, the peptide maintains their non-pathogenic profile and decreases their Th17/1 profile.

At the same time, we examined the **VIP function on the *in vitro* polarization of human Th memory cells into Th17 subset**. First, analysis of VPAC receptors expression indicate that VPAC₁ and VPAC₂ are expressed in Th17 polarized cells, which present an increased VPAC₂/VPAC₁ ratio compared to non-polarized Th cells. Data show that VIP is able to promote the Th17 response when the microenvironment conditions favour the Th17 response generation. Related to the phenotype of these cells, VIP is able to favour their non-pathogenic phenotype increasing the production of cytokines associated to the non-pathogenic profile. Moreover, VIP decrease the Th17/1 profile and increase the Treg/Th17 profile of these cells.

All results described above refer to murine or human Th and Th17 cells in healthy conditions, however we also analysed the VIP effect on Th cells in inflammatory environments. In mice, we determine the *in vivo* effect of the neuropeptide on Th subpopulation in a model of T1D, the NOD mice. On the other hand, in humans we checked the *in vitro* VIP function on Th cells from patients

with early RA. Related to **VIP effect on Th subsets from diabetic mice**, data shows that this neuropeptide negatively interferes with the functionality of Th17 cells. However, VIP increase the Th17 response over the Th1 response, while in diabetic mice the Th17/1 ratio decline during the progression of the disease. Moreover, VIP modulates the CD4⁺CD25⁺ T cells development and function, and may override the breakdown of self-tolerance during autoimmune diabetes in mice. Likewise, the peptide is able to modulate the Treg/Th17 balance, which is decreased during the disease, showing an increase in the Treg/Th17 ratio and leading to tolerance in NOD mice. Likewise, the treatment with VIP negatively modulates the Th1/Th2 ratio, increasing Th2 relative to Th1 subsets. All results are according to data observed in healthy mice, indicating that VIP is able to differentially modulate each Th subsets and the balances between different subpopulations in mice, having a crucial impact in diabetic mice. These results suggest that VIP could be a potential therapeutic agent in diabetic patients.

Otherwise, related to the study of the **VIP effect on Th and Th17 subsets from early RA patients** first we analysed the Th17 response and their relationships with other Th subsets compared with the Th cells from healthy donors. We detected that cells from RA patients are more committed to Th17 response, and they showed a more pathogenic phenotype and a greater Th17/1 profile than cells from healthy donors. Next, we study the VIP effect on *in vitro* activated Th cells and on *in vitro* polarized Th17 from RA patients. Analysis of VPAC receptors expression indicate that VPAC₁ and VPAC₂ are expressed in both activated Th and polarized Th17 cells, which present an increased VPAC₂/VPAC₁ ratio compared with non-polarized Th cells. With respect to activated Th cells, results suggest that VIP decreases the Th17 response. Also, on these cells, VIP decreases their pathogenic phenotype, reducing the expression of markers associated to pathogenic profile. On the other hand, VIP favours the Th17 response after the *in vitro* polarization of Th cells into Th17 subset. However, the peptide inhibits the pathogenic phenotype of these cells, decreasing the pathogenic markers, inhibiting the Th17/1 profile and favouring the Treg/Th17 profile. Therefore, results from RA patients showed that VIP modulates *in vitro* the Th17 subset in these patients, and it could be interesting for RA treatment.

Based on these results, the specific **conclusions of this Doctoral Thesis** are:

1. VPAC₁ and VPAC₂ receptors are expressed in human Th cells after *in vitro* activation and after their *in vitro* differentiation or polarization into Th17 subtype.
2. *In vitro* differentiated and polarized Th17 cells exhibit a change in the VIP receptors expression pattern, showing an increased VPAC₂/VPAC₁ ratio.
3. In patients with early RA, VPAC₁ and VPAC₂ receptors are expressed on *in vitro* activated memory Th lymphocytes and on *in vitro* polarized Th17 cells, showing increased expression of both receptors in activated Th cell and increased VPAC₂/VPAC₁ ratio in polarized Th17 cells compared to cells of healthy donors.

4. The neuropeptide VIP differentially modulates the Th subpopulations after *in vitro* activation of Th cells from Balb/c mice, inhibiting the Th1 and the Th17 responses, and promoting the regulatory T response.
5. VIP modulates the balance between different subpopulations of *in vitro* activated Th cells from Balb/c mice, increasing the Th17/Th1, Th2/Th9, Treg/Th17 and Treg/Th1 balances, and decreasing the Th1/Th2 balance.
6. VIP inhibits the Th17 response, the pathogenic phenotype and the Th17/1 profile of *in vitro* activated memory Th cells from healthy donors.
7. The neuropeptide VIP induces the *in vitro* differentiation of human Th17 cells. Likewise, VIP promotes the proliferation, maintains their non-pathogenic phenotype and reducing their Th17/1 profile.
8. VIP promotes the *in vitro* polarization of human Th17 cells from memory Th lymphocytes from healthy donors. Likewise, the peptide increases their non-pathogenic phenotype, it favours their regulatory T profile, and it inhibits their Th17/1 profile.
9. In the NOD model of experimental autoimmune diabetes, VIP inhibits the Th17 response while it promotes the Treg response. Moreover, this neuropeptide modulates the balance between different Th subsets, increasing Th17/Th1 and Treg/Th17 balances and decreasing the Th1/Th2 balance.
10. *In vitro* activated Th cells and *in vitro* polarized Th17 cells from patients with early RA show an increased Th17 response, a greater pathogenic phenotype and a greater Th17/1 profile than cells from healthy donors.
11. In patients with early RA, VIP shows an inhibitory effect on the Th17 response and the pathogenic profile of *in vitro* activated memory Th cells.
12. In patients with early RA, VIP promotes the Th17 response of memory Th lymphocytes after their *in vitro* polarization. However, the peptide inhibits their pathogenic phenotype and their Th17/1 profile, and it increases their Treg/Th17 profile.

In summary, although additional studies are needed to clarify completely the VIP effect, all conclusions show that VIP modulates the Th cells and specifically the Th17 subset in both, murine and human species. Likewise, the peptide is able to modulate these cells in healthy and inflammatory conditions, showing crucial evidences for design of novel therapies in inflammatory and autoimmune diseases.

Otros artículos

OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS

Urokinase plasminogen activator system in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients: modulation by inflammatory mediators and neuropeptides.

Pérez-García S, Carrión M, **Jimeno R**, Ortiz AM, González-Álvaro I, Fernández J, Gomariz RP y Juarranz Y. J. Mol. Neurosci., 2014; 52 (1): 18-27.

Inflammatory mediators alter interleukin-17 receptor, interleukin-12 and -23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immunomodulation by vasoactive intestinal Peptide.

Carrión M, Pérez-García S, **Jimeno R**, Juarranz Y, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I y Gomariz RP. Neuroimmunomodulation, 2013; 20(5): 274-84.

RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide.

Carrión M, Juarranz Y, Pérez-García S, **Jimeno R**, Pablos JL, Gomariz RP y Gutiérrez-Cañas I. Arthritis Rheum., 2011; 63 (6): 1626-36.

